

Design, Synthese und Evaluation von Protease- und Kinase-Inhibitoren in Modellen der Alzheimer-Demenz



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Binia Drung
aus Hildesheim

Referent: Prof. Dr. B. Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. G. Buntkowsky

Tag der Einreichung: 17. Juli 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2014

Darmstadt 2014


D17





Meiner Familie





Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Boris Schmidt am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt seit Februar 2010 angefertigt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. B. Schmidt für die Betreuung dieser Arbeit, der regelmäßigen Bereitschaft zur Diskussion, den Anregungen jeglicher Art sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken. Durch die interessanten Themenstellungen durfte ich mich mit zahlreichen Aspekten der medizinalchemischen Forschung beschäftigen.

Danken möchte ich auch meinen ehemaligen Kollegen Eva Naumann, Andrea Zall, Daniel Kieser und Alexander Boländer, die mir nicht nur sehr gute Kollegen waren, sondern auch gute Freunde in einer neuen Stadt geworden sind.

Allen aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises – Constantin Voss, Christoph Scholz, Stefan Göring, Theresa Neumann, Parul Goel, Johannes Pilakowski und Frau Keenan – danke ich für das gute Teamwork, der steten Hilfsbereitschaft und den zahlreichen gemeinsamen Stunden, auch neben der Arbeit im Labor.

Mit Stefan und Theresa hatte ich das Glück, an zwei Laborkollegen zu geraten, die nicht nur zu einer angenehmen Atmosphäre und guten Zusammenarbeit im Labor beigetragen haben, sondern auch darüber hinaus.

Ein besonderer Dank gilt Christoph für seinen unerschütterlichen Optimismus, der einen einfach in jeder Situation aufbaut.

Ich danke allen, die an der gewissenhaften Korrektur dieser Arbeit beteiligt waren.

Den zahlreichen Kooperationspartnern bin ich für die fachliche Unterstützung ausgesprochen dankbar.

Auch danke ich allen Studenten, die ich in Praktika und Abschlussarbeiten betreuen durfte, sowie allen Hiwis, die mir bei den Praktika zur Seite gestanden haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für ihre Arbeit danken. Ohne die vielen Messungen von Massen- und NMR-Spektren sowie das reparieren von Wasserhähnen, Rohrschäden und Lampen wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke meinen Freunden, dass sie Freunde sind.

Gar nicht genug danken, kann ich meiner Familie und dabei besonders meinen Eltern und meinem Mann für einfach Alles!

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

- Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Höttecke, Eva C. Naumann, Binia Thomaszewski, Katrin Schneider, Dirk T. Steinbacher, Robert Schubanel, Stefan Masur, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt, „NSAID-derived γ secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold“, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19, 4903-4909.
- Valentina Lo Sardo, Chiara Zuccato, Germano Gaudenzi, Barbara Vitali, Catarina Ramos, Marzia Tartari, Michael A. Myre, James A. Walker, Anna Pistocchi, Luciano Conti, Marta Valenza, Binia Drung, Boris Schmidt, James Gusella, Scott Zeitlin, Franco Cotelli, Elena Cattaneo, „An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin“, *Nature Neuroscience* **2012**, 15, 5, 713-721.
- Alison M. Cooper, Philip S. Hobsen, Mark R. Jutten, Michael W. Kao, Binia Drung, Boris Schmidt, David J. Fear, Andrew J. Beavil, James M. McDonnell, Brian J. Sutton, Hannah J. Gould, „Soluble CD23 Controls IgE Synthesis and Homeostasis in Human B Cells“, *The Journal of Immunology* **2012**, 188, 7, 3199-3207.
- Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Luyang Lin, Changcun Fang, Guanmei Wen, Tsung-Neng Tsai, Xiangyuan Pu, David Sims, Zhongyi Zhang, Xiaoke Yin, Binia Thomaszewski, Boris Schmidt, Manuel Mayr, Ken Suzuki, Qingbo Xu, Shu Ye, „Functional Role of Matrix Metalloproteinase-8 in Stem/Progenitor Cell Migration and Their Recruitment Into Atherosclerotic Lesions“, *Circulation Research* **2013**, 112, 35-47.
- Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Gianluca Grassia, Yanhua Hu, Zhongyi Zhang, Qiuru Xing, Xiaoke Yin, Marcella Maddaluno, Binia Drung, Boris Schmidt, Pasquale Maffia, Armando Ialenti, Manuel Mayr, Qingbo Xu, Shu Ye, „Matrix Metalloproteinase-8 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation“, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **2014**, 34, 90-98.
- Binia Drung, Christoph Scholz, Valeria Aquilino Barbosa, Azadeh Nazari, Maria Helena Sarrajiotto, Boris Schmidt, „Computational & experimental evaluation of the structure/activity relationship of β -carbolines as DYRK1A inhibitors“, wurde im Juni **2014** bei *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* zur Veröffentlichung eingereicht.

-
- Posterpräsentation: Constantin Voss, Binia Drung, Boris Schmidt, „*Does the customized in-house assay identify modifiers of in vivo radiation response? Ask the Fish!*“, GBS-Jahrestagung, 25.-27. September 2013, Darmstadt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Aminosäurenverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Die Alzheimer-Demenz	7
1.1.1. Die Entwicklung einer Krankheit	7
1.1.2. Die Diagnose, Pathologie und Behandlung von AD	8
1.1.3. Die amyloiden Plaques als Auslöser von AD	12
1.1.4. Neurofibrillenbündel als Auslöser von AD – die Tau-Hypothese	17
1.2. γ -Sekretase	20
1.2.1. Aufbau und Funktion	20
1.2.2. γ -Sekretase-Inhibitoren	23
1.2.3. γ -Sekretase-Modulatoren	25
1.3. DYRK1A	31
1.3.1. Einleitung, Aufbau und Funktion	31
1.3.2. DYRK1A als potentiell therapeutisches Target zur Behandlung von AD	34
1.3.3. DYRK1A-Inhibitoren	35
1.4. Carbazole und Aza-Analoga in der medizinischen Forschung	39
1.4.1. Carbazole und Aza-Analoga als privilegierte Leitstrukturen	39
1.4.1. Eine Leitstruktur viele Anwendungen: Die Problematik der Selektivität	44
1.4.2. Synthese von Carbazolen und Carbolinen	46
1.5. ADAM10	53
1.5.1. Einleitung	53
1.5.2. Aufbau	54
1.5.3. Substrate und Funktionen von ADAM10	57
1.5.4. ADAM10 als Ziel von pharmakologischen Interventionen	59
2. Zielsetzung	65
3. Ergebnisse und Diskussion	67
3.1. Entwicklung und Evaluation neuer γ -Sekretase-Modulatoren	67
3.1.1. Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Carbonsäurefunktion	67

3.1.2.	Einfluss der Position der Carbonsäureposition auf die γ -Sekretaseaktivität	79
3.1.3.	Untersuchung von PEG- und PPG-Seitenketten als „Membrananker“	82
3.1.4.	Lokalisation von γ -Sekretase-Modulatoren innerhalb der Membran	96
3.1.5.	Zusammenfassung und Ausblick	108
3.2.	Entwicklung und Evaluation neuer DYRK1A-Inhibitoren	110
3.2.1.	Entwicklung eines computergestützten Modells für das Design neuer DYRK1A-Inhibitoren	110
3.2.2.	Synthese von DYRK1A-Inhibitoren	116
3.2.3.	Biologische Evaluation der DYRK1A-Inhibitoren	127
3.2.4.	Untersuchung der DYRK1A-Inhibitoren hinsichtlich der Selektivität	130
3.2.5.	Zusammenfassung und Ausblick	136
3.3.	Untersuchungen von ADAM10 Funktionen mit Hilfe des selektiven Inhibitors GI254023X 91	140
3.3.1.	Einleitung	140
3.3.2.	Eine evolutionär frühzeitige neuroepitheliale Zelladhäsions-Funktion von Huntingtin impliziert ADAM10 und N-Cadherin	141
3.4.	Lösliches CD23 kontrolliert die Immunoglobulin E Synthese und Homöostase in humanen B-Zellen	154
3.5.	Eine funktionelle Rolle der Matrix-Metalloprotease-8 in der Stamm-/Vorläuferzell-Migration und deren Rekrutierung in atherosklerosen Läsionen	166
3.1.	Matrix-Metalloprotease-8 fördert die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen und die Ausbildung von Neointima	182
3.1.1.	Zusammenfassung und Ausblick	194
4.	Zusammenfassung und Ausblick	195
5.	Experimenteller Teil	198
5.1.	Allgemeine Anmerkungen	198
5.1.1.	Allgemeine Anmerkungen zu den chemisch-synthetischen Arbeiten	198
5.1.2.	Allgemeine Anmerkungen zu den biologischen Arbeiten	200
5.1.3.	Allgemeine Anmerkungen zur Neutronendiffraktion	201
5.1.4.	Allgemeine Anmerkungen zu den Docking-Methoden	203
5.2.	Beschreibung der Synthesen aus Kapitel 3.1	205
5.2.1.	Synthese von BSc4531 ²⁵¹	205

5.2.2.	Biologische Evaluation von BSc4531 ²⁵¹	206
5.2.3.	Synthese von BSc4530	207
5.2.4.	Biologische Evaluation von BSc4530	210
5.2.5.	Synthese der PEG- und PPG-Carprofenderivate aus Kapitel 3.1.3	211
5.2.6.	Synthese der Carprofenderivate aus Kapitel 3.1.4	220
5.2.7.	Biologische Evaluation der protonierten und deuterierten Carprofenderivate in Kapitel 3.1.4	226
5.3.	Beschreibung der Synthesen aus Kapitel 3.2	227
5.3.1.	Synthese der DYRK1A-Inhibitoren	227
5.3.2.	Biologische Evaluation der DYRK1A-Inhibitoren	232
5.3.3.	Biologische Evaluation der DYRK1A-Inhibitoren in Bezug auf MAO-A	233
6.	Literaturverzeichnis	234
7.	Anhang	246
7.1.	Abbildungsverzeichnis	246
7.2.	Erklärungen	252
7.3.	Lebenslauf	254

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Aβ	Amyloid-β-Peptid
Abb.	Abbildung
Abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACE2	Renal-Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer-Demenz, Alzheimer-Erkrankung (Alzheimer's disease)
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
ADAMTS	<i>ADAMs containing thrombospondin motifs</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	APP-intrazelluläre Domäne (<i>APP-intracellular domain</i>)
Aph-1	Anterior pharynx defective-1
ApoE	Apolipoprotein E
app	Amyloid β-Vorläuferprotein-Gen
APP	Amyloid β-Vorläuferprotein (<i>amyloid β-precursor protein</i>)
APPsα	löslichen Ektodomäne von APP im nicht-amyloiden Weg
APPsβ	löslichen Ektodomäne von APP im amyloiden Weg
Äq	Äquivalent
ASP	<i>alternative splicing factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	willkürliche Einheit der Streulängendichteprofile (<i>arbitrary unit</i>)
b	breites Signal (NMR), kohärente Streulänge (Neutronenbeugung)
BACE1	<i>β-site APP-cleaving enzyme-1</i>
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Bn	Benzyl
BSc	Boris Schmidt-Substanzdatenbankeintragsnummer
bzw.	beziehungsweise
C83	CTFα
C99	CTFβ
CD23	<i>cluster of differentiation</i> 23-Antigen
CD44	<i>cluster of differentiation</i> 44-Antigen
CD147	Basigin (<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>)

CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CLK	Cdc2-ähnliche Kinase (<i>Cdc2-like kinase</i>)
COX	Cyclooxygenase
CSF	Rückenmarksflüssigkeit (<i>cerebrospinal fluid</i>)
CTF	C-terminales Fragment der TMD der γ -Sekretase
CTF α	membrangebundenes C-terminales Fragment von APP im nicht-amyloiden Weg
CTF β	membrangebundenes C-terminales Fragment von APP im amyloiden Weg
CX3CL1	CX3C-Motiv-Chemokin-1
CXCL16	CXC-Motiv-Chemokin-16
Cys	Cystein-reiche-Domäne von ADAM10
d	Duplett (NMR)
DAGs	Diacylglycerine
DCC	<i>N, N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dis	Disintegrin-Domäne von ADAM10
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DS	Down-Syndrom
DSCR	<i>Down syndrome critical region</i>
DYRK1A	<i>dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase-1A</i>
DYRK	<i>dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGF	epidermale Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EOAD	<i>early onset AD</i>
ErbB2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2, <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
ErbB4	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-4 (HER4, <i>human epidermal growth factor receptor 4</i>)
ERK2	extrazelluläre signalregulierte Kinase 2 (<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>)
Et	Ethyl
eV	Elektronenvolt
f	femto
FAD	familiäre AD
g	Gramm
GASP	γ -Sekretase-aktivierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls

GSI	γ -Sekretase Inhibitor
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β (<i>glycogen synthase kinase 3β</i>)
GSM	γ -Sekretase Modulator
h	Stunde
HD	Huntington (<i>huntington's disease</i>)
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (ErbB2, <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
His	13-konsekutive-Histidin-Wiederholung in DYRK1A
htt	Huntingtin
HZ	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgE	Immunoglobulin E
iGSMs	inverse γ -Sekretase Modulatoren
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
JAM-A	<i>junctional adhesion molecule-A</i>
k	Kilo
DA	Dalton
L	Liter
LOAD	<i>late onset AD</i>
LRP1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein-1</i>
μ	mikro
m	Milli, Multiplett (NMR)
M	Molar
MAO-A	Monoaminoxidase A
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau-Gen
mCD23	membrangebundenes <i>cluster of differentiation 23</i> -Antigen
MDAM	<i>mammalian disintegrin-metalloprotease</i>
Me	Methyl
mIgE	membrangebundenes Immunoglobulin E
min	Minute
MP	Metalloprotease-Domäne von ADAM10

MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
m/z	Ionenmasse
n	Nano
Nct	Nicastrin
NFTs	Neurofibrillbündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
NLS	Kernlokalisationssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
Notch-IC	intrazelluläre Notchdomäne
NSAID	nicht-steroidaler Entzündungshemmer (<i>non steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
NTF	N-terminales Fragment der TMD der γ -Sekretase
p	Pentett (NMR)
p3	lösliches Peptid im nicht-amyloiden Weg
PAXIP1	PAX-interagierenden Protein 1-Gen (<i>PAX transcription activation domain interacting protein gene</i>)
PC7	Proteinkonvertase-7
PEG	Polyethylenglykol
Pen-2	<i>Presenilin enhancer-2</i>
PEST	Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threonin-reiche Domäne in DYRK1A
PKC	Proteinkinase C
pm	Pikometer
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl
POPC	2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PP-2A	Phosphoserin/Phosphothreonin-Protein Phosphatase 2A
PPG	Polypropylenglykol
ppm	<i>parts per million</i> ($= 10^{-6}$)
Pro	Prodomäne von ADAM10
pro-ADAM10	unreife Vorstufe von ADAM10
PS	Presenilin
ps1	Presenilin-1-Gen
PS1	Presenilin-1
ps2	Presenilin-2-Gen
PS2	Presenilin-2

RECK	<i>reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs</i>
q	Quartett (NMR)
s	Singulett (NMR)
δ	chemische Verschiebung (NMR)
SAP97	<i>Synapse associated protein-97</i>
sCD23	lösliches, <i>cluster of differentiation</i> 23-Antigen
SH3	Src-Homologie-3
siRNA	<i>small interfering-Ribonukleinsäure (small interfering ribonucleic acid)</i>
SLD	Streulängendichte
SPCs	Stamm-/Vorläuferzellen (<i>stem/progenitor cells</i>)
S/T	Serin-/Threonin-reiche Region in DYRK1A
SVMPs	<i>Snake venom metalloproteinases</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TMD	Transmembrandomäne
tPSA	<i>topological polar surface area</i>
t	Triplett
t_R	Retentionszeit
triCD23	trimeres <i>cluster of differentiation</i> 23-Antigen
u	Einheit Masse
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
VSMCs	vaskulären glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells)
Z	zytoplasmatische Domäne von ADAM10
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Aminosäurenverzeichnis

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer-Demenz

1.1.1. Die Entwicklung einer Krankheit

26. November 1901¹

Alois Alzheimer: „Wie heißen Sie?“
Patientin: „Auguste.“
Alois Alzheimer: „Familiennamen?“
Patientin: „Auguste.“
Alois Alzheimer: „Wie heißt ihr Mann?“
Patientin: „Ich glaube Auguste.“
Alois Alzheimer: „Ihr Mann?“
Patientin: „Ach so, mein Mann...“
Alois Alzheimer: „Sind Sie verheiratet?“
Patientin: „Zu Auguste.“
Alois Alzheimer: „Frau D.?“
Patientin: „Ja, zu Auguste D.“
Alois Alzheimer: „Wie lange sind Sie schon hier?“
Patientin: „3 Wochen.“

Etwas später isst Auguste D. Schweinefleisch mit Blumenkohl zu Mittag:

Alois Alzheimer: „Was essen Sie?“
Patientin: „Spinat.“ (Sie kaut das Fleisch)
Alois Alzheimer: „Was essen Sie jetzt?“
Patientin: „Ich esse erst Kartoffeln und dann Meerrettich.“

Diese Unterhaltung ist ein Auszug aus den Protokollen des Psychiaters und Neuropathologen Alois Alzheimer, die er über seine Patientin Auguste Deter anfertigte. Diese wurde erst wenige Tage vor dem beschriebenen Gespräch in der „Städtischen Heilanstalt für Irre und Epileptische“ in Frankfurt am Main aufgenommen. Nach dem Tod der Frau im Jahre 1906 untersuchte er das Gehirn mikroskopisch und fand eine Atrophie der Hirnrinde mit zahlreichen abgestorbenen Nervenzellen und einer „eigenartige Fibrillenerkrankung der

Nervenzellen“. Zusätzlich identifizierte Alzheimer Ablagerungen von Stoffwechselprodukten in Form von Plaques in der gesamten Hirnrinde. Im November des selben Jahres stellte er auf einer Fachtagung in Tübingen das Krankheitsbild unter dem Titel: „Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde“ vor.¹

Schnell wurde aus der eigenartigen Krankheit die Alzheimer-Erkrankung oder Alzheimer-Demenz (engl. *Alzheimer's disease* AD), die immer mehr in den Fokus der Öffentlichkeit rückt. Selten vergeht eine Woche ohne neue Artikel, Fernsehsendungen oder Talkshows, die sich mit dem Thema Demenzen beschäftigen.

Im Jahre 2010 wurde die Anzahl der weltweit an Demenz erkrankten Personen auf 35,6 Millionen geschätzt. Aufgrund des demographischen Wandels wird nahezu mit einer Verdopplung der Anzahl alle 20 Jahre gerechnet. Dieses würde für 2030 eine Zahl von 65,7 Millionen und für 2050 115,4 Millionen Demenzerkrankungen bedeuten.² Die Alzheimer-Demenz ist dabei die am weitesten verbreitete Form, mit etwa 70 % der auftretenden Erkrankungen.³

1.1.2. Die Diagnose, Pathologie und Behandlung von AD

Von den Symptomen zur Diagnose

Meist sind die ersten Symptome von AD wie Vergesslichkeit und Orientierungsschwächen in alltäglichen Situationen erkennbar. Den Patienten fällt es vermehrt schwer, komplexere Aufgaben zu bewältigen. Hierzu können auch schwierigere Haushaltsaufgaben wie z. B. das Erledigen von Bankgeschäften oder Kochen gehören. Das konstruktive Vorstellungsvermögen lässt nach. So ist auch eine häufige Aufgabe in mentalen Tests (z. B. Mini-Mental-Status-Test) zur Erstbeurteilung eines Patienten zwei ineinander verschränkte Fünfecke zu zeichnen (Abbildung 1).⁴ Zusätzlich können psychische Symptome wie emotionale Unruhe bis hin zur Depression auftreten.

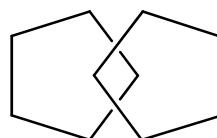


Abbildung 1: Verschränkte Fünfecke aus Mini-Mental-Status-Test. ⁴

Mit Fortschreiten der Demenz können erste Sprachstörungen, sowie Lese- und Schreibschwächen auftreten. Die Patienten scheinen in der Vergangenheit zu leben und haben Probleme mit einfachen Handlungen wie Essen oder Anziehen. Aufgrund von visuellen Wahrnehmungsstörungen werden teilweise nahestehende Familienmitglieder nicht mehr erkannt. Das nicht Erkennen von Personen und deren Absichten hat häufig aggressives Verhalten der Patienten zur Folge. Eine intensive Pflege der Patienten ist unumgänglich.

In späten Stadien der AD sind fast alle kognitiven Funktionen beeinträchtigt. Das vorher noch intakte früh-biographische Gedächtnis geht verloren und die Sprache wird auf den Gebrauch einzelner Wörter eingeschränkt, wodurch grundlegende Bedürfnisse nicht mehr artikuliert werden können. Als Folge extremer Apraxie werden motorische Funktionen wie Kauen und Schlucken geschädigt. Nach durchschnittlich fünf bis acht Jahren nach Diagnose führt AD zum Tode. Die häufigsten Todesursachen der geschwächten Alzheimer-Patienten sind Lungenentzündung, Herzinfarkt und Blutvergiftung.⁵⁻⁷

Amyloid- β -Plaques und Neurofibrillen – die Pathologien von AD

Erste pathologische Veränderungen im Gehirn von Patienten werden schon viele Jahre bis zu Jahrzehnte vor dem Auftreten von ersten deutlichen Symptomen und somit der klinischen Diagnose gebildet. Computertomographische Untersuchung von AD-Patienten im Vergleich zu normalen Alterserscheinungen identifizierte einen Verlust von Gewebe des mittleren Schläfenlappens um bis zu 15 % pro Jahr. Diese Atrophie basiert auf der Rückbildung von Myelin sowie dem Schrumpfen oder Absterben von Neuronen und Nervenfasern, welche mit der Schwere der Symptome einhergehen.^{8, 9}

Schon Alois Alzheimer erkannte bei der histologischen Untersuchung des Gehirngewebes von Auguste Deter neben einer Gehirn-Atrophie zwei Arten von pathologischen Veränderungen. Die intrazellulären Neurofibrillenbündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) und extrazellulären amyloiden Plaques gelten noch heute als pathologische Merkmale von AD, welche zum aktuellen Stand erst *post mortem* sicher diagnostiziert werden können (Abbildung 2).^{10, 11}

Basierend auf der Bildung von NFTs in Zellkörpern, Neuropil-Fasern und Dendriten wird die Ausprägung der Cortexzerstörung in sechs sogenannte „Braak-Stadien“ unterteilt. Dabei korreliert die Menge und Verteilung der Neurofibrillen mit dem Fortschreiten des kognitiven Verfalls. NFTs sind zuerst in der transentorhinalen Region zu finden und werden über den Hippocampus bis zum Neocortex verbreitet.^{12, 13} In 2014 konnte von Khan *et al.* der Startpunkt der Ausbreitung der NFTs präzisiert werden. Der entorhinale Cortex besteht aus lateralen und medialen Anteilen, welchen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden.

Imaging- und histologische Experimente an Patienten, sowie an drei unterschiedlichen Mausmodellen konnten den lateralen entorhinalen Cortex als primär betroffene Region identifizieren.¹⁴

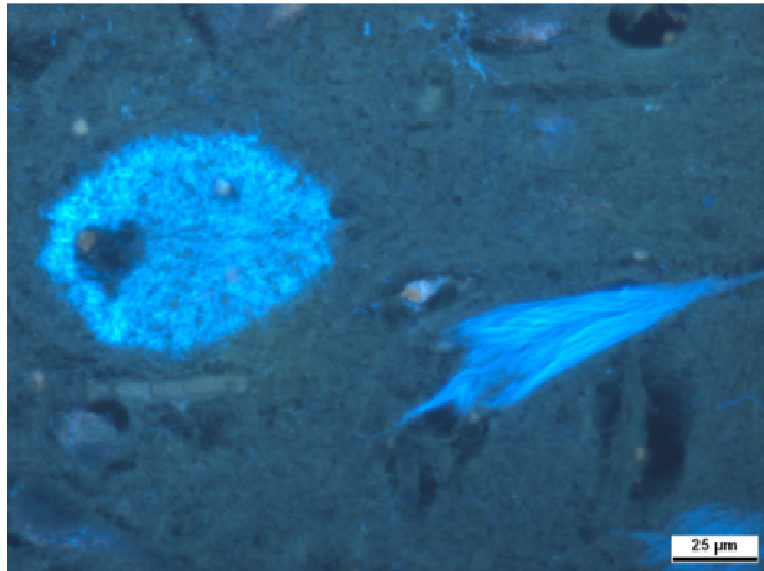


Abbildung 2: Histochemische Färbung eines Aβ-Plaques (links) und neurofibrillären Bündel (rechts) auf humanem Gehirngewebe. Färbung mit 4,6-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrimidin. Kopie aus A. Boländer *et al.* 2012 mit freundlicher Genehmigung von Author und Verlag. Copyright 2013 American Chemical Society.¹⁵

Die Ausbreitung von Aggregaten aus Amyloid-β-Peptiden (Aβ) im Gesamthirn wird in fünf Phasen, je nach betroffener Region, untergliedert. Die Aβ-Ablagerungen treten zuerst im Neocortex auf und werden über die entorhinale Region und den mittleren Schläfenlappen verbreitet. Später sind sie auch im Hippocampus, basalen Vorderhirn und Hirnstamm zu finden, bis sie schließlich bis ins Kleinhirn vorgedrungen sind. Allerdings scheint die Verbreitung der Plaques im Gegensatz zu den NFTs nicht direkt der Schwere der Demenz zu entsprechen. So wurden Aβ-Ablagerungen auch bei nicht dementen Personen gefunden.^{16, 17}

Da bisher noch kein Zusammenhang der beiden pathologischen Merkmale mit der Entstehung von AD sicher nachgewiesen werden konnte, gibt es unterschiedliche Erklärungsversuche basierend auf der Bildung des jeweiligen Eiweißaggregats. Die „Amyloidhypothese“ und „Tau-Hypothese“, sowie deren molekularen Grundlagen werden in den Abschnitten 1.1.3 und 1.1.4 vorgestellt.

Therapeutische Ansätze

Seit den 90er Jahren ist die Behandlung von AD möglich, doch können die zugelassenen Medikamente bisher nur die Symptome lindern und nicht das Fortschreiten der Krankheit verhindern. Drei der zugelassene Wirkstoffe sind Galantamin[®] **1**, Donepezil[®] **2** und Rivastigmin[®] **3**, die bei Patienten mit milder bis mittelschwerer AD eingesetzt werden können (Abbildung 3). Alle drei sind Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer), deren Wirkung auf der Verminderung des Abbaus des Neurotransmitters Acetylcholin basiert. Als Folge des Absterbens von Neuronen bei AD tritt ein Acetylcholin-Mangel auf, der die Informationsübermittlung im Gehirn beeinträchtigt. Durch Applikation der AChE-Hemmer können die kognitiven Auffälligkeiten vermindert werden. Allerdings ist die therapeutische Wirksamkeit meist nur mäßig und kann bei andauernder Behandlungszeit nachlassen.¹⁸

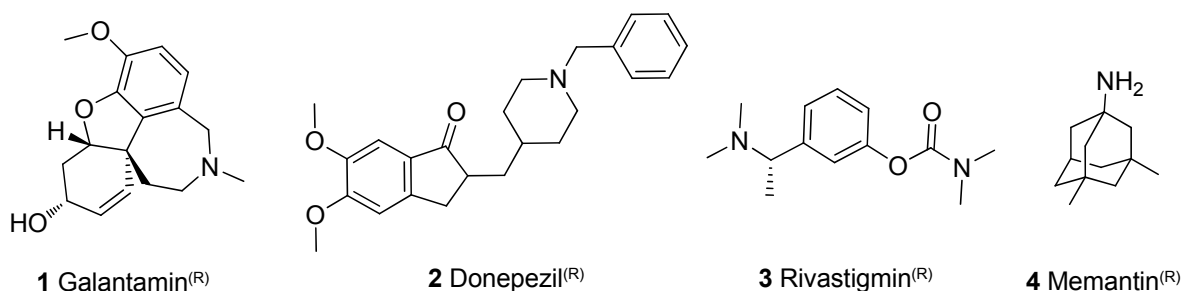


Abbildung 3: Strukturformeln der Therapeutika zur Behandlung von AD.¹⁹

Bei Patienten mit mittleren bis schweren Symptomen wird Memantin[®] **4** als *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonist eingesetzt. Dabei kann der Wirkstoff **4** sowohl einzeln als auch in einer Kombinationstherapie mit Cholinesterase-Inhibitoren appliziert werden. Dieser nicht-kompetitive Antagonist vermittelt den Ionentransport in die Zelle und hebt damit die schädigende Wirkung des erhöht ausgeschütteten Glutamats auf. Der Neurotransmitter Glutamat beeinflusst den Kalziumgradienten, wodurch es zum Absterben von Nervenzellen kommen kann. Eine Verbesserung der kognitiven Leistungen wurde beobachtet.^{5, 20, 21}

Zahlreiche weitere Medikamente und therapeutische Konzepte, die auf beiden Hypothesen, der Amyloidhypothese und Tau-Hypothese basieren, sind in der Erforschung. In klinischen Studien konnten einige vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Doch wurde bis heute keine Möglichkeit zum Aufhalten der Krankheit gefunden.

1.1.3. Die amyloiden Plaques als Auslöser von AD

Die Amyloidhypothese

Auf Grundlage der in AD-Patienten auftretenden Plaques im Zentralnervensystem, die hauptsächlich aus amyloiden- β -Peptiden bestehen, wurde Anfang der 90er Jahre die Amyloidhypothese entwickelt, welche dieses pathologische Merkmal als Ursache der Erkrankung herausstellt.¹⁰ Es wird angenommen, dass durch die Akkumulation der neurotoxischen Peptide eine pathogene Kaskade initiiert wird, die andere Pathologien, wie NFTs, Zellverlust und dementes Verhalten, von AD auslöst (Abbildung 4). Zusätzlich wird durch die vermehrte Bildung von A β , initiiert durch ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau, die metabolische und ionische Homöostase unterbrochen, oxidativer Stress ausgelöst und die Aktivität einiger Kinasen verändert.⁵ Die These basiert auf mehreren schlüssigen Indizienketten, darunter die eigentlichen histologischen Befunde sowie die Eigenschaften der A β -Peptide und die Genetik der Alzheimer-Demenz, letztere wird im folgenden Kapitel vorgestellt.¹⁰

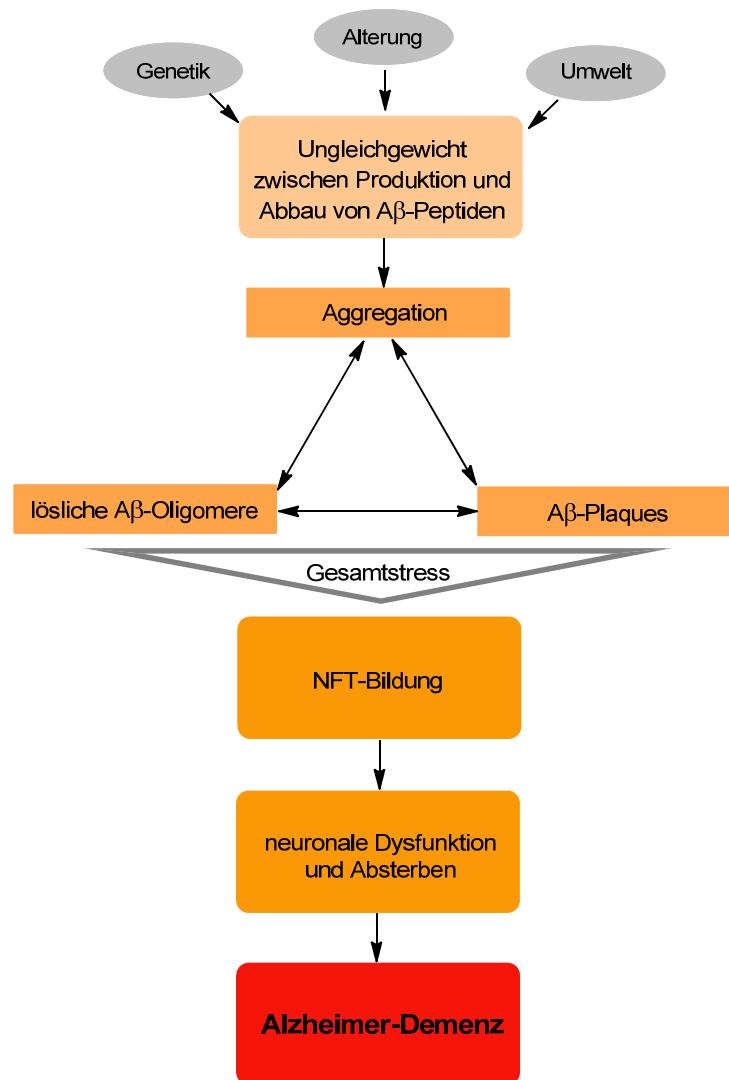


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hypothese der Amyloidkaskade bei AD.^{5, 22}

Etwa 20 Jahre nach Entwicklung der Hypothese musste diese aufgrund aktueller Forschungsergebnisse dahingehend erweitert werden, dass die makroskopischen Plaques nicht als einziger Auslöser betrachtet werden. Auch lösliche Aβ-Oligomere fördern das Fortschreiten der Krankheit. So konnte im transgenen Mausmodell für AD ein Zusammenhang von Aβ-Oligomeren und dem kognitiven Verfall beobachtet werden.^{23, 24}

Die Inhibition oder Umkehrung der Plaquebildung bzw. der oligomeren Vorstufen ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Alzheimer-Patienten. In Folge dessen wurde die letzten Jahrzehnte intensiv an Lösungsvorschlägen geforscht, die auf der Amyloidhypothese beruhen. Trotzdem ist diese These nicht allgemein anerkannt, zumal wie bereits beschrieben, kein direkter quantitativer Zusammenhang zwischen Aβ-Plaques und Demenz-Symptomen hergestellt werden kann.^{5, 22}

Die Genetik der AD

Die AD-Fälle werden, je nach Alter des Patienten bei Auftreten der Erkrankung, in zwei unterschiedliche Klassen unterteilt. In über 95 % der Fälle erkranken Personen über einem Alter von 65 Jahren, dann wird von *late onset* AD (LOAD) gesprochen. Erkrankungen, die üblicherweise um das 50. Lebensalter auftreten, werden als *early onset* AD (EOAD) klassifiziert. Diese EOAD-Fälle betragen nur 1-5 % der Gesamtzahl an Alzheimer Erkrankungen.³ Im Falle von EOAD wird häufig auch von der familiären Alzheimer-Demenz (FAD) gesprochen, da diese hauptsächlich durch genetische Mutationen ausgelöst wird. Diese FAD wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % in den betroffenen Familien vererbt und bei Vererbung des mutierten Gens kommt es mit fast 100 %-iger Wahrscheinlichkeit zum Ausbruch der Krankheit.⁵ Im Wesentlichen wurden Mutationen von drei Genen in FAD-Fällen gefunden. Dabei handelt es sich um die Gene Presenilin-1 (ps1) auf dem Chromosom 14, Presenilin-2 (ps2) auf Chromosom 1 und Amyloid β -Vorläuferprotein (app, *amyloid β precursor protein*) auf Chromosom 21. Für ps1 wurden bislang 185 verschiedene Mutationen gefunden, während für das homologe ps2 nur 13 Mutationen bekannt sind. Im Falle des app sind 24 Mutationen (plus Duplikate) beobachtet worden. Nahezu alle dieser Mutationen führen zu einer Erhöhung des $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnisses, wodurch die Amyloidhypothese gestützt wird.²⁵ Es wurde gezeigt, dass $A\beta_{42}$ die Plaquebildung initiiert und mehr zur Aggregation neigt als kürzere $A\beta$ -Fragmente.²⁶

Andere in Einzelfällen auftretende Mutationen, die mit FAD verbunden werden, beispielsweise im Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau (MAPT) -Gen (Chromosom 17), im Chromosom 7 nahe dem PAX-interagierenden Protein 1-Gen (paxip1, *PAX transcription activation domain interacting protein gene*) und im *Presenilin enhancer-2* (Pen-2)-Gen, müssen noch näher untersucht werden.²⁵

Bei den viel häufigeren LOAD-Erkrankungen spielt meist eine Kombination aus genetischen Varianten, Umwelteinflüssen und Risikofaktoren aus dem täglichen Leben eine Rolle. Der einzig etablierte genetische Risikofaktor ist eine Mutation des $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoprotein E (APOE) -Gens auf Chromosom 19. Durch diese Mutation wird das Risiko an AD zu erkranken, je nach Ausprägung, um ein vier- bis 15-faches gesteigert. Die genaue metabolische Auswirkung dieser Mutation ist noch unbekannt.²⁵

Auch wenn sich LOAD und EOAD/FAD in ihren Ursachen und Entstehung stark differenzieren, sind sie im Spätstadium kaum zu unterscheiden. So treten in beiden Arten eine verstärkte $A\beta_{42}$ -Ablagerung und damit Plaquebildung auf, wie auch die gleichen klinischen

Demenz-Symptome. Diese Ähnlichkeit wird in beiden Fällen als Indiz für die pathogene Rolle des A β -Peptids herangezogen, wodurch auch LAOD die Amyloidhypothese unterstützt.⁵

Der APP-Metabolismus – die molekulare Bildung der A β -Peptide

Die vermehrte Bildung von A β -Peptiden und das veränderte Verhältnis der Fragmente A β_{42} /A β_{40} zueinander ist die Folge eines gestörten APP-Metabolismus. APP ist die Abkürzung für das Amyloid β -Vorläuferprotein (*amyloid β -precursor protein*), welches ein Typ-I-Membranprotein ist. Dieses 110-120 kDa Membranprotein besteht aus einer relativ großen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Exprimiert wird APP im Gehirn und in den meisten Geweben, wobei es hauptsächlich in den drei Isoformen APP695, APP751 und APP770 auftritt. APP695 ist aus 695 Aminosäuren aufgebaut und die dominante Form in Neuronen. Die beiden anderen Isoformen werden überwiegend von anderen Zellen gebildet. Die eigentliche physiologische Funktion des APP ist noch unklar.^{10, 11, 27}

Das Vorläuferprotein wird durch drei Transmembranproteasen, den α -, β -, und γ -Sekretasen, sequenziell proteolytisch prozessiert. Es wird zwischen zwei unterschiedlichen Wegen unterschieden, dem AD auslösenden amyloidogenen und dem „gutartigen“ nicht-amyloidogenen Weg (Abbildung 5). Normalerweise tritt der amyloidogene Weg nur zu 10 % und der nicht-amyloidogene Weg zu 90 % auf, wird das Verhältnis gestört, kommt es zu den beschriebenen krankhaften Veränderungen.²⁸

Beim nicht-amyloidogenen Weg werden keine neurotoxischen A β -Fragmente freigesetzt. Zuerst wird das APP-Membranprotein von der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne in zwei Teile gespalten, einer löslichen Ektodomäne (APPs α) und ein kleineres membrangebundenes C-terminales Fragment (CTF α), wodurch im Anschluss kein A β -Peptid mehr gebildet werden kann. Das CTF α wird auch als C83-Fragment bezeichnet, da dieses aus 83 Aminosäuren besteht. Die freigesetzte Ektodomäne weist eine neurotrope und neuroproliferative Aktivität auf, welche die vorteilhafte Wirkung dieses Weges unterstützt. Die als α -Sekretase aktiven Enzyme gehören zur Klasse der ADAM (*α disintegrin and metalloprotease*)-Proteasen, von denen drei, ADAM9, ADAM10 und ADAM17, mit der Funktion im APP-Metabolismus in Verbindung gebracht werden. Nach der ersten Spaltung wird von dem membrangebundenen C83-Teilstück von der γ -Sekretase ein lösliches p3-Peptid abgetrennt, welches schnell abgebaut wird. Die APP-intrazelluläre Domäne (AICD, *APP intracellular domain*) wird ins Cytoplasma freigesetzt. Die γ -Sekretase ist eine Aspartyl-Protease, die aus vier Untereinheiten aufgebaut ist (Kapitel 1.2).²⁹

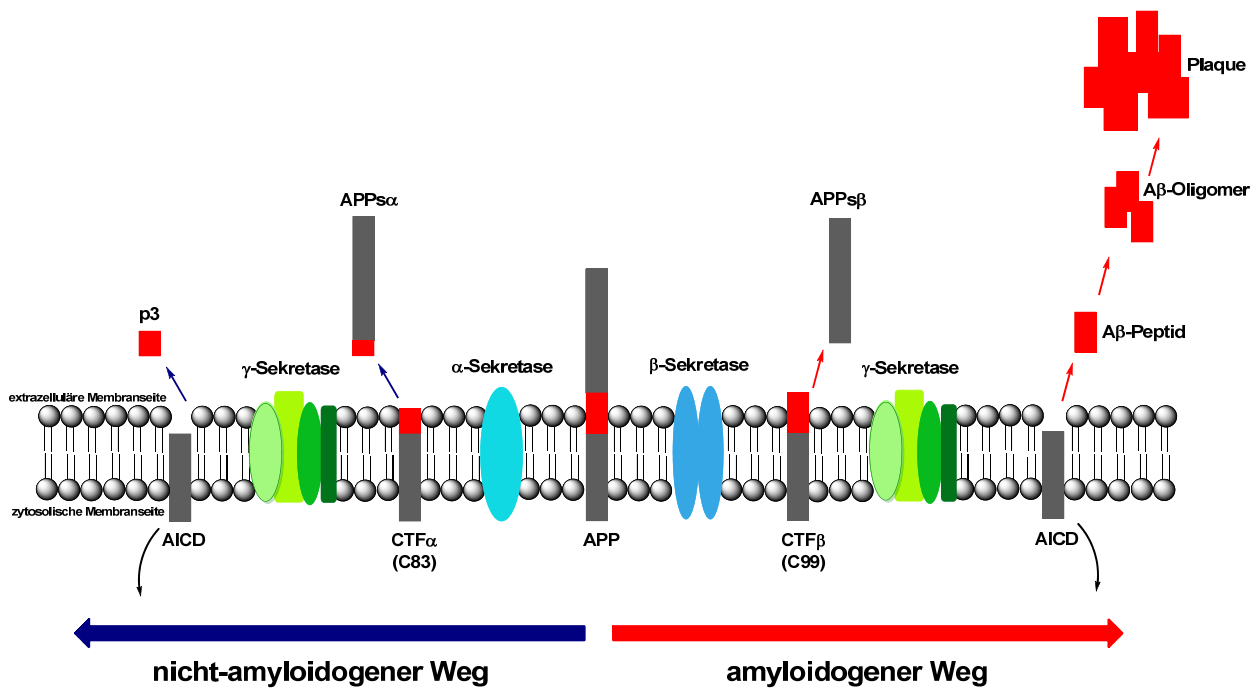


Abbildung 5: Schematische Darstellung des nicht-amyloidogenen (links) und amyloidogenen (rechts) Wegs des APP-Metabolismus.²⁹

Im konkurrierenden amyloidogenen Abbau wird APP zuerst von der β -Sekretase prozessiert, wobei wiederum eine lösliche Ektodomäne (APPs β) und ein membrangebundenes C-terminales Fragment (CTF β), welches in diesem Fall aus 99 Aminosäuren zusammengesetzt ist (C99), entstehen. Die β -Sekretase ist wie die γ -Sekretase eine Aspartylprotease und gehört zur Familie der Pepsin-ähnlichen Proteasen. Sie wird nach ihrer Funktion auch als BACE1 (*β -site APP-cleaving enzyme*) bezeichnet. Anschließend wird das C99-Teilstück von der γ -Sekretase gespalten, wobei das A β -Peptid extrazellulär und erneut das AICD-Ende ins Cytoplasma freigesetzt werden.^{29, 30}

Diese A β -Peptide sind etwa 4 kDa schwere Fragmente, die je nach dem an welcher der benachbarten Positionen APP gespalten wird, unterschiedliche Längen aufweisen können. Hauptsächlich entsteht A β_{40} , zu weniger als 10 % wird das zur Aggregation neigende A β_{42} gebildet. In geringeren Anteilen treten andere Peptidlängen auf, die zwischen A β_{36} und bis zu A β_{46} variieren können. Aus den einzelnen Peptiden werden Oligomere, Fibrillen und letztendlich die Amyloidplaques gebildet. Der genaue Mechanismus der Aggregation ist bis heute unbekannt, es gibt aber Anzeichen dafür, dass Protein-Fehlfaltungen hierfür verantwortlich sind.^{29, 31, 32}

1.1.4. Neurofibrillenbündel als Auslöser von AD – die Tau-Hypothese

Intrazelluläre Neurofibrillenbündel stellen ein weiteres pathologisches Merkmal in den Gehirnen von AD-Patienten dar, dessen Verbreitung. Die Verbreitung dieser NFTs konnte direkt mit den auftretenden kognitiven Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden. Hierauf bezieht sich die Tau-Hypothese, die besagt, dass eine fehlgesteuerte Phosphorylierung, die sogenannte Hyperphosphorylierung, von Tau zu der Entwicklung der Krankheit führt.³³

Tau ist das wichtigste Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) in Axonen, welches partiell phosphoryliert an Tubulin bindet und die Mikrotubuli stabilisiert. Die Mikrotubuli sind für die gesunde Funktion der Neuronen wichtig. Ein kontinuierlicher anterograder, retrograder und axonaler Transport verläuft über große Distanzen entlang der Mikrotubuli und wird durch Motorproteine wie Kinesine und Dyneine vermittelt. Zusätzlich sind die Mikrotubuli, als Teil des Cytoskeletts, für die Form und Stabilität der einzelnen Zellen erforderlich.⁵

Das Tau-Protein wird von einem einzigen Gen auf Chromosom 17 codiert, von dem je nach Splicingmechanismus sechs verschiedene Isoformen im menschlichen adulten Gehirn gebildet werden können. Diese Isoformen bestehen aus 352 bis 441 Aminosäuren und sind 45-65 kDa schwer. Die längste Tau-Isoform (Tau441) enthält 79 Serin (Ser)- und Threonin (Thr)-Reste, die potentiell phosphoryliert werden können. Unter normalen physiologischen Bedingungen können mindestens 30 dieser Stellen phosphoryliert werden, von denen im adulten Organismus nur zwei Phosphatreste aufweisen. Im gesunden Organismus herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen an Mikrotubuli-gebundenem und freiem Tau, welches aufgrund des hydrophilen Charakters wasserlöslich und größtenteils ungefalteter vorliegt.^{34, 35}

Tritt ein Ungleichgewicht zwischen Kinase und Phosphatase auf, wird Tau hyperphosphoryliert. Mehrere Proteinkinasen wurden mit der Phosphorylierung von Tau in Verbindung gebracht. Die drei wichtigsten sind die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (*glycogen synthase kinase 3 β* , GSK3 β), die Cyclin-abhängige Kinase 5 (*cyclin-dependent kinase 5*, CDK5) und die extrazelluläre signalregulierte Kinase 2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*, ERK2).³³ Phosphorylierungen an 25 möglichen Aminosäurepositionen wurden in hyperphosphorylierten Tau in AD identifiziert.³³

Das aktivste Enzym, das Tau dephosphoryliert, ist die Phosphoserin/Phosphothreonin-Protein Phosphatase 2A (PP-2A), welche zusammen mit Tau und den Mikrotubuli im Gehirn lokalisiert ist. In AD sind sowohl die Menge an vorhandener mRNA von PP-2A als auch die Aktivität des Enzyms verringert. Gleichzeitig wurden erhöhte Kinaseaktivitäten beobachtet.³⁶

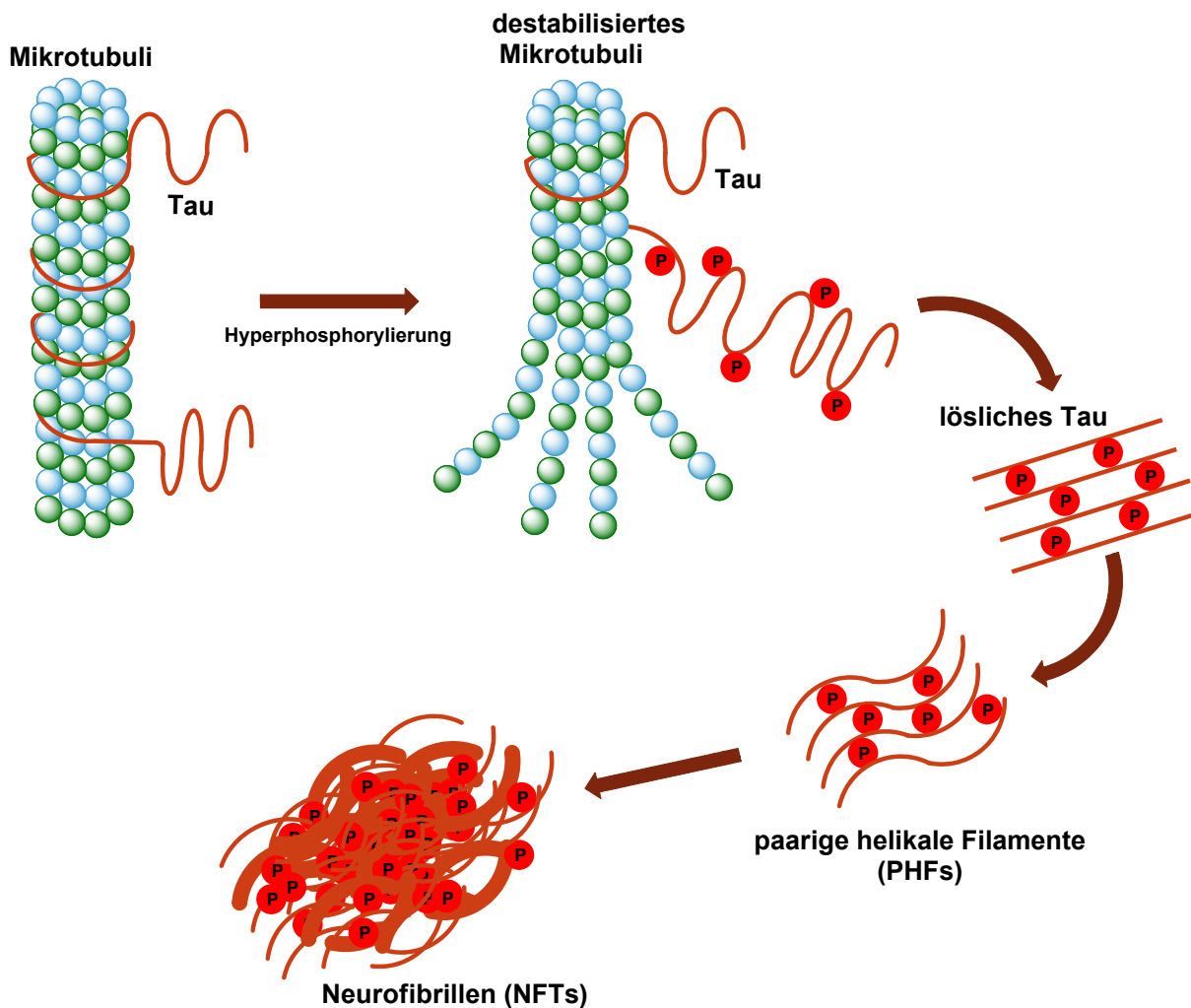


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Hyperphosphorylierung von Tau und der anschließenden Aggregation bis zur Bildung von NFTs. ³³

Weiterhin wurde eine achtfach erhöhte Gesamtkonzentration von Tau in Gehirnen von AD-Patienten im Vergleich zu nicht betroffenen Patienten gefunden. Bei vorliegender AD-Erkrankung liegt das überschüssige Tau hyperphosphoryliert vor.³⁷ Durch die Hyperphosphorylierung werden die Wechselwirkungen zwischen den Mikrotubuli und Tau geschwächt, wodurch es zu einer Ablösung des Tau kommt und das dynamische Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Tau gestört wird. Auch kann hyperphosphoryliertes Tau „normales“ Tau und mikrotubuliassoziierte Proteine binden. Als Folge werden die Mikrotubuli destabilisiert und depolymerisiert. Darüber hinaus neigt hyperphosphoryliertes Tau zur Selbstassoziation, die zu Ablagerung in Form von Präfibrillen führt. Unter Konformationsänderung zu β -Faltblattstrukturen werden sogenannte paarige

helikale Filamente (PHFs) gebildet, die zu großen unlöslichen Neurofibrillären Bündeln aggregieren (Abbildung 6).⁵

Die Destabilisierung der Mikrotubuli sowie die Anhäufung der NFTs führen zu einem gestörten axonalen Transport und Neurotransmission, welche direkt mit den beobachteten Symptomen der kognitiven Einschränkungen in AD zusammenhängen. Außerdem wird die gesamte Morphologie der Zelle gestört, sodass es zum Absterben derselben kommt.⁵

Die Inhibition der NFT-Bildung scheint eine aussichtsvolle Strategie für die Erforschung neuer therapeutischer Behandlungen zu sein. Der wahrscheinlich am meisten erforschte Bereich ist dabei die Inhibition der phosphorylierenden Kinasen. Aber auch die Hemmung der Tau-Aggregation und Fibrillenbildung ist vorteilhaft. Einige Derivate aus den Substanzklassen der Anthraquinone, *N*-Phenylamine, Phenylthiazolhydrazine und Rhodamine lieferten gute Ergebnisse. Eine verminderte Aggregation, sowie ein Abbau der toxischen Filamente wurde beobachtet. Eine Aktivierung der Phosphatasen (z. B. PP-2A) ist denkbar, aber lieferte noch keine publizierten Ergebnisse.^{33, 38}

1.2. γ -Sekretase

1.2.1. Aufbau und Funktion

Die membranverankerte γ -Sekretase ist im amyloidogenen Weg des APP-Metabolismus involviert. Das von der β -Sekretase hinterlassene C99-Fragment von APP wird von der γ -Sekretase gespalten, wobei amyloide- β -Peptide und AICD freigesetzt werden.

Bei der γ -Sekretase handelt es sich um eine ~ 20 kDa Aspartyl-Protease des GxGD-Typs, die aus einem Komplex aus vier Membranproteinen in stöchiometrischer Zusammensetzung besteht: Presenilin (PS), Nicastrin (Nct), Anterior pharynx defective-1 (Aph-1) und Presenilin enhancer-2 (Pen-2) (Abbildung 7).^{27, 39, 40}

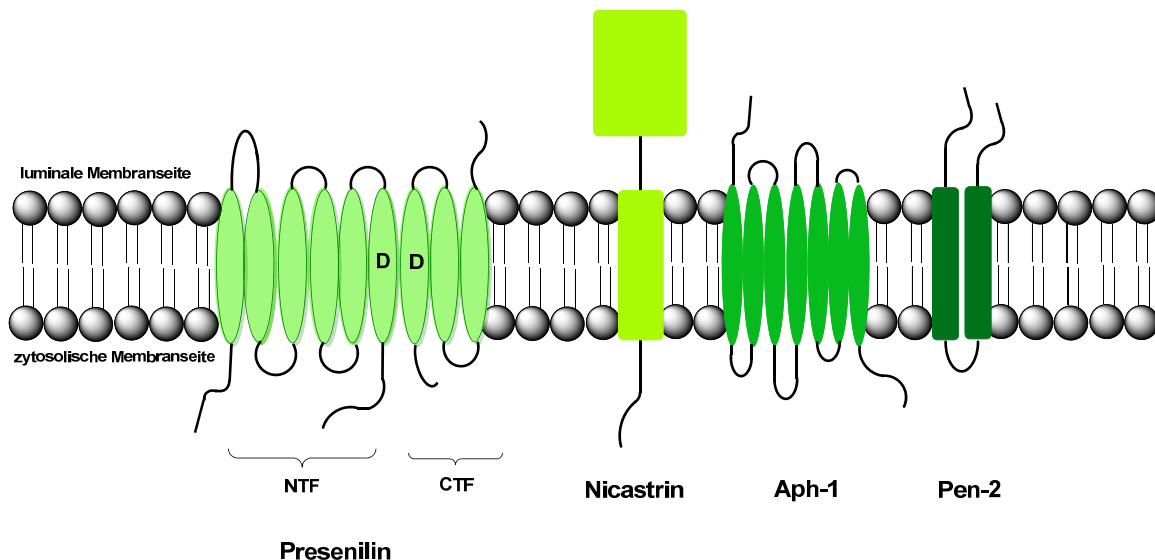


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Membranproteine des γ -Sekretasekomplexes.²⁶

Es wird angenommen, dass Presenilin die eigentlich aktive Komponente des Enzymkomplexes darstellt. Zwei Gene, ps1 und ps2, die in Zusammenhang mit EOAD stehen, codieren zwei Isoformen des ~ 50 kDa Membranproteins.²⁷ Experimente mit *knockout*-Varianten des Presenilin-1 Gens zeigten eine starke Reduktion an γ -Sekretase-Aktivität, woraus geschlossen wurde, dass Presenilin diese Proteolyse veranlasst.⁴¹

Das aus neun Transmembrandomänen (TMD) aufgebaute PS ist in zwei Untereinheiten aufgespalten, einem N-terminalen Fragment (NTF) und einem C-terminalen Fragment (CTF). Dieses NTF-CTF-Heterodimer, welches durch Autoproteolyse zwischen der sechsten und siebten TMD entsteht, stellt die aktive Form des PS dar. Beide Fragmente weisen jeweils

einen Asparaginsäurerest in den zugewandten TMD 6 und TMD 7 (Asp 257 und Asp385 bei humanen PS1) auf, die zusammen das katalytische Zentrum bilden. Beide Asparaginsäurereste sind sowohl für die endoproteolytische Spaltung der Presenilinuntereinheiten als auch für die Spaltung von Substraten durch die γ -Sekretase essentiell.^{5, 27}

Die Spaltung der Substrate erfolgt über einen Säure-Base-Mechanismus unter Addition eines Wassermoleküls. Der Mechanismus ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.⁴²

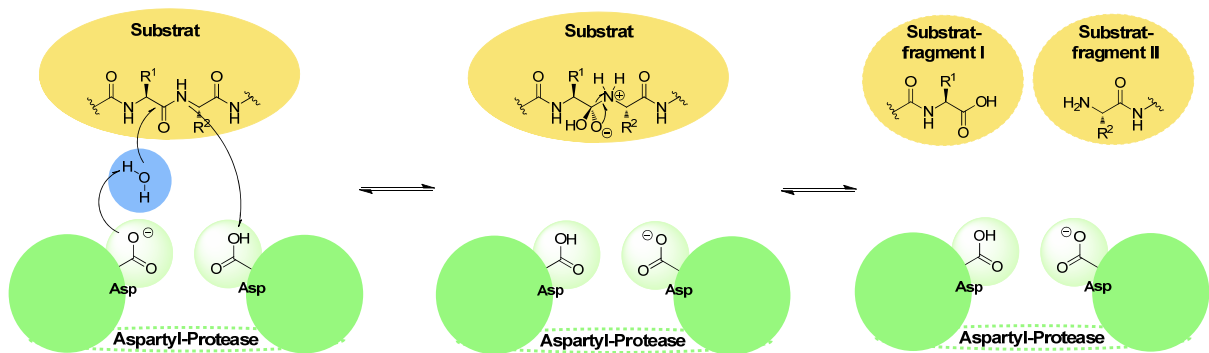


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Substrat-Proteolyse durch eine Aspartyl-Protease.⁴²

Ein mit PS interagierendes Protein ist Nicastrin, welches für die γ -Sekretase-Aktivität sowie Endoproteolyse von PS notwendig ist. Nct ist ein 120-140 kDa Glykoprotein vom Typ I der Membranproteinen, welches zum Großteil extrazellulär vorliegt. Es konnten zwei Formen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgrad nachgewiesen werden, von denen die höher glykosylierte Form mit der PS-Interaktion assoziiert ist.⁴³ Die große Ectodomäne von Nct ist für die Substraterkennung zuständig. So wird der durch vorherige Spaltung von extrazellulären APP frei gewordene Aminoterminus gebunden und dadurch das Substrat dem γ -Sekretasekomplex zur Verfügung gestellt.⁴⁴

Aph-1 ist ein aus sieben Transmembrandomänen aufgebautes Protein, von dem drei Isoformen (Aph-1aS, Aph-1aL, Aph-1b) bekannt sind. Ähnlich wie Nct spielt Aph-1 eine wichtige Rolle beim Aufbau des Enzymkomplexes und dessen Stabilität, sowie der Substraterkennung. Pen-2 besteht aus zwei Domänen und unterstützt die Endoproteolyse des Presenilins. Die vollständigen biochemischen Funktionen der Untereinheiten bleiben noch unklar, dennoch sind beide Bestandteile unverzichtbar.⁵

Alle vier Untereinheiten des γ -Sekretasekomplexes sind für die Aktivität notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass der jeweilige *knockdown* der entsprechenden Gene eine Deaktivierung

der APP-Spaltung erzeugt. Und erst die Überexpression aller vier Proteine führt zu einer erhöhten γ -Sekretase Aktivität.^{45, 46}

Einige nicht-essentielle Kofaktoren wurden identifiziert, wie z. B. CD147, TMD21, GSAP (γ -Sekretase-aktivierendes Protein), β -Arrestin-1, β -Arrestin-2, die mit dem γ -Sekretasekomplex assoziiert sind und die Aktivität beeinflussen.³²

Bis heute konnte die γ -Sekretase trotz zahlreicher Bemühungen nicht vollständig isoliert und kristallisiert werden, wodurch die Proteinstruktur des gesamten Komplexes noch unklar ist. Teilweise Reinigung konnte das Vorliegen aller vier Untereinheiten als Bestandteile der γ -Sekretase bestätigen. Eine Kombination aus Elektronenmikroskopie und computerbasierte single-particle image Analyse konnte einen kugelförmigen 120 Å langen Membranprotein-komplex offenbaren, der einen 20-40 Å langen zylindrischen Hohlraum beinhaltet. Dieser Hohlraum könnte einer proteolytisch aktiven Tasche, die von der hydrophoben Lipid-Doppelschicht der Membran abgetrennt ist, entsprechen. Poren mit einer Größe von 20 Å auf Unter- und Oberseite des Membranproteins werden als Ausgänge für Spaltprodukte in und aus der Zelle vorgeschlagen.⁴⁷

Im Gegensatz zur β -Sekretase, die hauptsächlich im zentralen Nervensystem vorkommt, konnte der γ -Sekretasekomplex in vielen Geweben nachgewiesen werden.⁵ Inklusive APP als Substrat der γ -Sekretase wurden inzwischen mehr als 90 weitere Substrate identifiziert. Dazu gehören der CD44-Rezeptor, die E- und N-Cadherine, die Kinase ErbB4, das Protein LRP1, der p75-Neurotrophin-Rezeptor, die Notch-Rezeptoren (1-4), die Notch Liganden Delta, Jagged und viele mehr. So zahlreich wie die Substrate sind auch die möglichen Auswirkungen der γ -Sekretase-Spaltung, zum Beispiel auf Gentranskription, Zelldifferenzierung, Zelltodregulation, Zelladhäsion, Angiogenese und Tumorentwicklung.⁴⁸

Trotzdem gilt die γ -Sekretase aufgrund ihrer Schlüsselfunktion in der Pathogenese von AD als vielversprechendes Target im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapien gegen Alzheimer-Erkrankungen. Klinische Studien von γ -Sekretase-Inhibitoren mussten basierend auf zahlreichen Nebeneffekten eingestellt werden, welche häufig auf die Funktion der γ -Sekretase im Notch-Signalweg zurückgeführt wurde.⁴⁹

Die Funktion der γ -Sekretase im Notch-Signalweg beruht auf der Spaltung des transmembranen Notch-Rezeptors. Aktiviert wird der Notch-Signalweg durch Bindung der Notch-Liganden Jagged und Delta an dem Rezeptor, woraufhin zuerst eine Abpaltung einer extrazellulären Domäne durch die α -Sekretase stattfindet. Infolge der anschließenden Spaltung seitens der γ -Sekretase wird eine intrazelluläre Notchdomäne (Notch-IC) freigesetzt, welche in den Zellkern eindringt. Dort aktiviert Notch-IC die Transkription von Targetgenen. Die physiologische Funktion von der Notch-Signalgebung ist vielfältig, so wird dadurch die

Zelldifferentierung während der Zellentwicklung, die Proliferation oder das Zellabsterben kontrolliert. Aber auch die Spezifikation der Zellen wird durch Notch mitbestimmt, genauso wie die Erhaltung und Erneuerung von adultem Gewebe.⁵⁰

Eine vollständige Inhibition der γ -Sekretase führt zwar zu einer Hemmung des amyloiden Weges des APP-Metabolismus, wodurch keine A β -Fragmente und daraus resultierend Plaques gebildet werden, aber auch der Notch-Signalwegs wird beeinträchtigt. Als Folge werden diverse essentielle physiologische Vorgänge dysreguliert und nachteilige Nebeneffekte der potentiellen AD-Medikamente treten auf. Basierend auf den zahlreichen Substraten der γ -Sekretase wird heute vermehrt nach Substanzen geforscht, die möglichst nur den APP-Metabolismus beeinflussen.⁵¹

1.2.2. γ -Sekretase-Inhibitoren

Die γ -Sekretase ist ein wichtiges Target zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von AD. Aufgrund der relevanten Rolle der γ -Sekretase bei der Plaque-Bildung, welche eins der AD-assoziierten Pathogene darstellt, wurden zahlreiche γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) entwickelt. Inzwischen sind weitere Substrate bekannt, wozu auch der Notch-Signalweg gehört, dessen kontinuierliche Inhibition zu einigen teils drastischen Nebeneffekten führt. Basierend auf der Kenntnis der weiteren Funktionen der γ -Sekretase, neben dem APP-Metabolismus, wird heute hauptsächlich nach Substanzen geforscht, die andere Substratprozessierungen nicht beeinflussen. Dennoch sollen in diesem Abschnitt einige GSIs vorgestellt werden, ohne deren Entwicklung und biologische Evaluation die Forschung in diesem Bereich wahrscheinlich nicht soweit fortgeschritten wäre.

Es werden drei Arten von GSIs in Abhängigkeit ihrer Bindungsstelle unterschieden. Es gibt GSIs, die an das aktive Zentrum der γ -Sekretase binden. Alternativ kann eine Inhibition auf der Bindung des Inhibitors an die Andockstelle des Substrates beruhen. Als dritte Untergruppe werden alle GSIs zusammengefasst, die eine alternative Bindungsstelle aufweisen und dadurch die γ -Sekretase inhibieren.⁵²

Einer der bekanntesten GSI ist der Peptid-basierte Inhibitor DAPT 5 (Abbildung 9) von ELAN/Eli Lilly, der eine hohe Aktivität im Zellaassay zeigt ($IC_{50} = 20$ nM).⁵¹ DAPT 5 war der erste GSI von dem gezeigt werden konnte, dass nach oraler Verabreichung des Inhibitors eine *in vivo* Aktivität auftritt. Im transgenen PDAPP-Mausmodell korreliert die Abnahme der A β -Peptid-Menge zu der gemessenen Wirkstoffkonzentration im Gehirn, woraus ein EC_{50} von 100 mg/kg bestimmt wurde. Die *in vivo* Aktivität wurde zwei Jahre später auch in einem weiteren transgenen Mausmodell (Tg2576) verifiziert.^{53, 54} In einer *in vivo* Studie an

Zebrafisch-Larven wurde eine Inhibition von Notch durch DAPT **5** anhand von abnormaler Embryonalentwicklung gezeigt. Daraus kann auf das mögliche Auftreten von kritischen Nebenwirkungen durch *in vivo* Applikation von GSI **5** an adulte Organismen geschlossen werden.⁵⁵

Derivatisierungen von DAPT **5** führten zu dem γ -Sekretase-Inhibitor LY-411575 **6** von Eli Lilly, der im zellulären Assay eine Aktivität im pikomolaren Bereich aufweist ($IC_{50} = 30 \text{ pM}$).⁵¹ Im transgenen Mausmodell wird die Menge an A β -Peptiden im Gehirn, Plasma und Rückenmarks-Flüssigkeit (CSF) reduziert ($EC_{50} < 1 \text{ mg/kg}$).⁵⁶ Im nicht-transgenen Ratenmodell wurden ähnlich Aktivitäten beobachtet. Allerdings verursacht eine Verabreichung des GSI **6** an transgene Mäuse über 15 Tage Magen-Darm-Blutungen und Immunsuppression, welche auf die Inhibition von Notch zurückgeführt werden.^{51, 57}

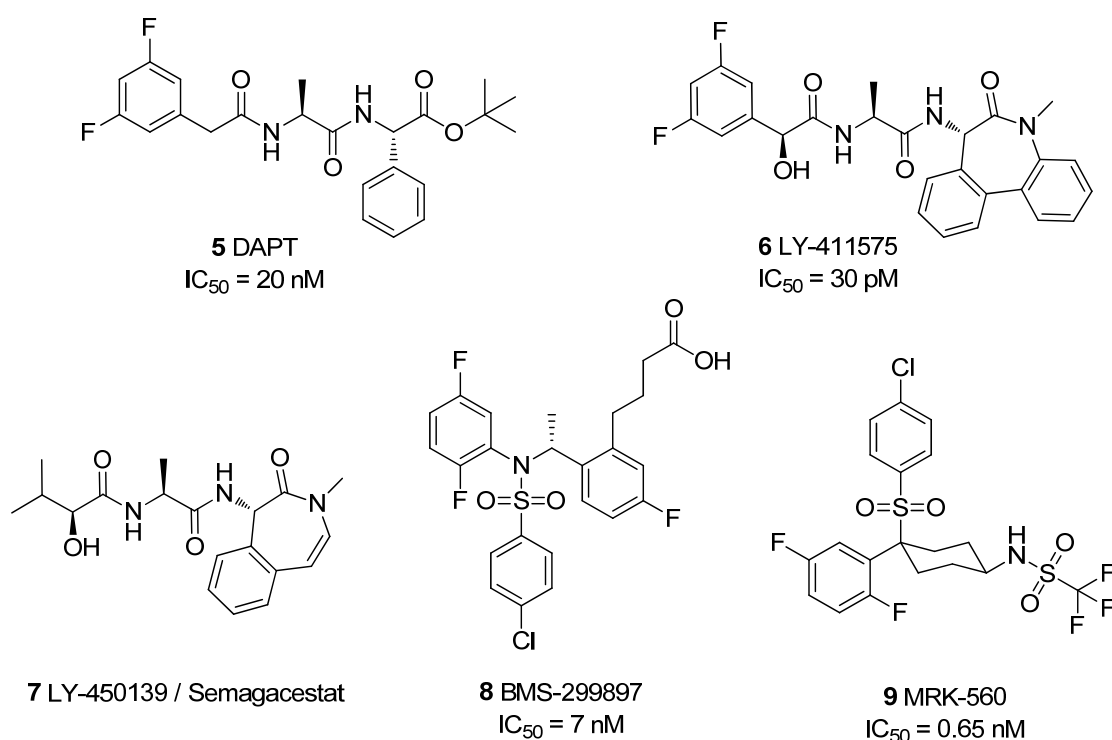


Abbildung 9: Strukturformeln und IC_{50} -Werte einiger γ -Sekretase-Inhibitoren.^{51, 58}

Ein strukturell verwandter γ -Sekretase-Inhibitor LY-450139 **7**, auch Semagacestat **7** genannt, wurde ebenfalls von Eli Lilly entwickelt (Abbildung 9). Zwar ist dieser GSI **7** um einiges weniger aktiv als sein Vorgänger **6**, doch scheint dieser selektiver gegenüber APP zu sein. Im nicht-transgenen Meerschweinchenmodell konnte eine Korrelation zwischen der Wirkstoffkonzentration und dem A β -Peptid-Level beobachtet werden. Allerdings führten nur

hohe Konzentrationen zu einer Verringerung der A β -Menge in Plasma, Gehirn und CSF. Niedrige Konzentrationen erhöhten den A β -Anteil im Plasma vorübergehend.^{5, 59} Der Inhibitor **7** wurde in klinischen Studien bis Phase III evaluiert, welche aber frühzeitig im Jahre 2013 abgebrochen wurde. In einem Testset aus insgesamt 463 AD-Patienten wurde täglich 189 Personen Placebo, 153 Personen 100 mg und 121 Personen 140 mg Semagacestat **7** verabreicht. Im Vergleich zu den Placebo-Kontrollen wurden bei den mit Semagacestat **7** behandelten Gruppen verschlechterte kognitive Leistungen und ein verschlechtertes Verhalten in alltäglichen Situationen beobachtet. Zusätzlich traten Nebenwirkungen auf, wie erhöhter Gewichtsverlust, vermehrte Erkrankungen an Hautkrebs und eine erhöhte Anzahl an Infektionen.⁶⁰

Es wurde berichtet, dass einige GSI eine Selektivität gegenüber PS1 enthaltenen γ -Sekretasekomplexen im Vergleich zu denen mit PS2 zeigen. Dazu gehört das Arylsulfonamid **8**, welches unter der Bezeichnung BMS-299897 von Bristol-Myers Squibb veröffentlicht wurde. Im transgenen Mausmodell wurde eine Reduktion an A β -Peptid im Plasma, Gehirn und CSF beobachtet. Im *in vitro* Assay weist **8** eine 15-fach erhöhte Aktivität gegenüber der APP-Spaltung im Vergleich zur Notch-Spaltung ($IC_{50}(APP) = 7$ nM, $IC_{50}(Notch) = 106$ nM)⁵⁸ auf, welches aber nicht mit der Selektivität gegenüber PS1 assoziiert wird. Bei einer Applikation von 100 mg/kg über zwei Wochen traten keine mit dem Notch-Signalweg in Verbindung stehenden Nebeneffekte auf.^{58, 61, 62}

Ein von der Firma Merck entwickelter GSI ist MRK-560 **9**, welcher potent die Spaltung von APP durch die γ -Sekretase inhibiert ($IC_{50} = 0.65$ nM).⁵⁸ Zusätzlich ist **9** oral verfügbar und durchdringt die Blut-Hirn-Schranke. Die oralen pharmakokinetischen Eigenschaften scheinen geeignet für eine einmalige Applikation pro Tag. Die Wirksamkeit des Inhibitors **9** konnte im transgenen Mausmodell (Tg2576) und nicht-transgenen Ratenmodell gezeigt werden. Im Ratenmodell konnte eine Reduktion von A β_{40} im Gehirn ($EC_{50} = 6$ mg/kg) und CSF ($EC_{50} = 10$ mg/kg) beobachtet werden.⁶³ Im transgenen Mausmodell konnte bei täglicher Verabreichung von 3 mg/kg eine verminderte Bildung von Plaques ohne Auftreten von Nebeneffekten in Darm, Milz oder Thymus beobachtet werden. Daraus wurde auf eine Notch-aussparende Selektivität geschlossen.^{58, 63, 64}

1.2.3. γ -Sekretase-Modulatoren

Da γ -Sekretase-Inhibitoren neben dem APP-Metabolismus meist auch den Notch-Signalweg hemmen, treten in *in vivo* Studien häufig zahlreiche teils drastische Nebeneffekte auf, welche die klinische Anwendbarkeit der GSI beeinträchtigen. Eine zufällige Beobachtung bei

Experimenten mit nichtsteroidalen Entzündungshemmern (NSAID, *non-steroid anti-inflammatory drug*) führte zu einer neuen Klasse γ -Sekretase-beeinflussender Substanzen, sogenannter γ -Sekretase-Modulatoren (GSMs). Die NSAIDs, wie Ibuprofen **10**, Indomethacin **11** und Sulindac-Sulfid **12**, zeigen eine Veränderung in der A β -Peptid Zusammensetzung. Während der Anteil an A β ₄₀ konstant bleibt, wird weniger des A β ₄₂, aber vermehrt A β ₃₈ gebildet (Abbildung 10).⁶⁵

Diese Art der Beeinflussung der γ -Sekretase ist im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit vielversprechend, da A β ₄₂, die längere Isoform der amyloiden- β -Peptide, als Hauptschuldiger in der Pathogenese von AD angesehen wird. In den meisten Fällen von *early-onset-AD*, die durch Mutationen von Presenilin oder APP hervorgerufen werden, wurden erhöhte A β ₄₂-Konzentrationen gemessen. Die anfängliche Plaquebildung wird auf Aggregation von A β ₄₂-Peptiden zurückgeführt. Zusätzlich haben biophysikalische Studien *in vitro* gezeigt, dass die längeren A β -Peptide mehr zur Aggregation neigen als kürzere Formen.^{65, 66}

Die Wirkung von NSAIDs als GSM wurde im Jahre 2001 von Weggen *et al.* beschrieben. In Zellkulturen wurde durch Zugabe von Sulindac-Sulfid **12** oder Ibuprofen **10** eine Reduktion des A β ₄₂-Levels von bis zu 80 % beobachtet, wobei die Wirkung abhängig von der Dosierung des jeweiligen GSM ist. Im transgenen Mausmodell (Tg2576) führte eine Applikation von Ibuprofen **10** zu einer Verminderung an A β ₄₂ im Gehirn. Ein großer Vorteil dieser Modulation der γ -Sekretase besteht darin, dass keine Auswirkungen auf den Notch-Signalweg beobachtet wurden. Zugabe von Naproxen **13** *in vitro*, einem weiteren NSAID, zeigte keinerlei Effekt auf die γ -Sekretase-Aktivität, woraus auf einen Wirkmechanismus unabhängig von den eigentlichen entzündungshemmenden Verhalten geschlossen wurde. Inzwischen konnte mehrfach gezeigt werden, dass die modulierende Wirkung der NSAIDs nicht auf der eigentlichen Funktion der Inhibition von COX1- und COX2- Enzymen (COX – Cyclooxygenase) beruht. So weist zum Beispiel R-Flurbiprofen **14** (Tarenflurbil) keine Hemmung von COX auf, wurde aber als moderat aktiver GSM identifiziert (Abbildung 10). R-Flurbiprofen **14** senkt das A β ₄₂-Level in nahezu gleichem Ausmaß wie S-Flurbiprofen **15** und *rac*-Flurbiprofen **16** (IC₅₀(A β ₄₂) ~ 300 μ M).^{52, 65, 67, 68}

Von Myrex Inc. (ursprünglich Myriad Pharmaceuticals) wurde Tarenflurbil **14** (hier MPC-7869) in einer klinischen Studie der Phase III evaluiert. Nachdem es in Phase II deutliche Hinweise auf die Wirksamkeit des GSM **14** gab, konnte in Phase III keine Verlangsamung des kognitiven Verfalls und der Beeinträchtigungen in alltäglichen Situationen beobachtet werden. Die Studie wurde 18 Monate lang an 1649 Patienten mit milden AD durchgeführt, denen entweder zweimal täglich 800 mg Tarenflurbil **14** oder Placebo

verabreicht wurde. Eine leichte Erhöhung der Inzidenz von Schwindel, Blutarmut und Infektionen trat als Nebenwirkung auf.⁶⁹

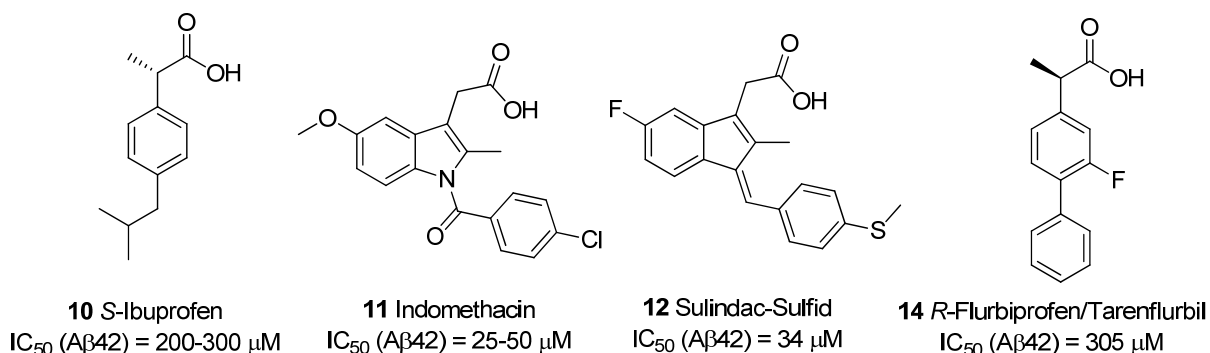


Abbildung 10: Strukturformeln und IC₅₀-Werte von NSAID-basierten GSMs.^{52, 65, 67}

Da die NSAID-basierten GSM, auch als erste Generation der GSM betitelt, nur moderate Aktivitäten und Gehirn-Eindringungsvermögen aufweisen, wurden in den kommenden Jahren zahlreiche verbesserte GSMs entwickelt. Die sogenannte zweite Generation GSMs können in drei Gruppen unterteilt werden: den NSAID-abgeleiteten Carbonsäure-GSMs, den nicht-NSAID-abgeleiteten Heterozyklischen-GSMs und den Naturstoff-abgeleiteten GSMs.³²

Zu der Gruppe der NSAID-abgeleiteten GSMs gehört zum Beispiel der von Flurbiprofen **14** abgeleitete Modulator CHF 5074 **17** von Chiesi Pharmaceuticals Inc., der eine siebenfach gesteigerte Aktivität im Vergleich zu der Leitstruktur aufweist (IC₅₀(Aβ₄₂) = 41 μM) (Abbildung 11).⁷⁰ Zu den Eigenschaften dieses Modulators gehört, dass COX1 und COX2 nicht inhibiert werden, doch leider konnte die Gehirnpenetration im Gegensatz zu Flurbiprofen **14** nur leicht verbessert werden. Im transgenen Mausmodell konnte nach sechs monatiger Behandlung eine Reduktion an Plaques in Anzahl und Ausbreitung im Cortex und Hippocampus beobachtet werden. Zusätzlich wurden Mikroglia-Entzündungen reduziert und räumliches Gedächtnisvermögen verbessert. Klinischen Studien konnten allerdings die vielversprechenden Ergebnisse nicht unterstützen, so wurde keine Absenkung des Aβ₄₂-Levels in Plasma oder CSF gefunden. Die klinische Phase II wurde zwar geplant, aber noch vor Beginn der Studie in 2012 abgebrochen.⁷¹⁻⁷⁴

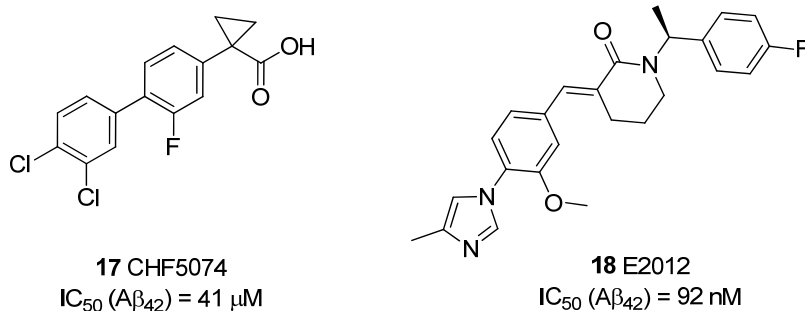


Abbildung 11: Strukturformeln und IC_{50} -Werte CHF5074 **17** und E2012 **18**.^{32, 70, 75}

E2012 **18** ist der erste GSM, der es in die klinische Entwicklung geschafft hat und nicht von NSAIDs abgeleitet wurde (Abbildung 11). Der auf einem Imidazol-Grundgerüst basierende Modulator kann der zweiten Gruppe den nicht-NSAID-abgeleiteten heterozyklischen-GSMs zugeordnet werden. GSM **18** verringert sowohl die Konzentration von $A\beta_{42}$, wie auch $A\beta_{40}$ und $A\beta_{39}$. Im Gegenzug wird das Level an $A\beta_{37}$ und in geringerem Ausmaß $A\beta_{38}$ gesteigert, insgesamt wird die Gesamtkonzentration an $A\beta$ -Peptiden nicht verändert. Bei oraler Applikation einmal täglich über drei Tage von E2012 **18** an Ratten wurde eine Verringerung an $A\beta_{42}$ - und $A\beta_{40}$ -Peptiden in CSF, Gehirn und Plasma beobachtet. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass *in vitro* der Notch-Signalweg bis $3 \mu M$ nicht beeinträchtigt wird. Eine parallel zur Phase I der klinischen Studie durchgeführte vorklinische Studie an Ratten, in der hohe Wirkstoffkonzentrationen über 13 Wochen verabreicht wurden, führte zur Beobachtung einer Linsentrübung bei den Versuchstieren. Daraufhin wurde die klinische Studie unterbrochen und konnte erst nach Ausschluss von Sicherheitsmängeln durch weitere vorklinische Analysen fortgesetzt werden. In der klinischen Studie der Phase I konnte eine dosierungs-abhängige Reduktion des Anteils an $A\beta_{42}$ und $A\beta_{40}$ registriert werden. Ende 2012 sollte die klinische Studie der Phase II starten, welche aber vor Auswahl der Patienten abgebrochen wurde. Begründet wurde das nicht Fortsetzen der klinischen Prüfung von E2012 **18** von Eisai durch die Entwicklung eines verbesserten, potenteren GSM E2212 **19**. Allerdings weist ein in 2013 publiziertes Experiment darauf hin, dass nach wiederholter Applikation von E2012 **18** in Ratten Erkrankungen an grauem Star auftraten. Die klinische Studie Phase I mit E2212 **19** von Eisai wurde im November 2012 abgeschlossen. Bis jetzt wurden weder Struktur des GSM **19** noch Ergebnisse der Studie veröffentlicht.^{52, 75-77}

Auch in der Arbeitsgruppe Schmidt wurden zahlreiche GSM entwickelt. Eine wichtige Leitstruktur bildete dabei der COX2-Inhibitor Carprofen **20**, der für die Applikation bei Hunden, Kühen und Pferden unter den Markennamen Imadyl® und Rimadyl® zugelassen ist.⁷⁸

Carprofen **20** selber ist ein schwacher γ -Sekretase-Inhibitor ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 76 \mu M$) der durch Einführung von lipophilen Substituenten zu γ -Sekretase-Modulatoren modifiziert wurde (Abbildung 12).⁷⁹ Dabei konnten Aktivitäten bis in den einstelligen mikromolaren Bereich erreicht werden. Es wird angenommen, dass der lipophile Rest als Membrananker die Orientierung in der Membran stabilisiert. Dieser lipophile Substituent kann sowohl aus einer alkylierten Sulfonfunktion, wie z. B. in BSc2842 **21** bestehen, als auch aus einer Alkylkette, wie z. B. in BSc3041 **22** (Abbildung 12). Aufgrund der um im Schnitt 50 % erhöhten *topological polar surface area* (tPSA)-Werte bei den sulfonierten Derivaten wird davon ausgegangen, dass diese weniger wahrscheinlich die Blut-Hirn-Schranke passieren können, weshalb die Weiterentwicklung der alkylierten Derivate favorisiert wurde.⁷⁹

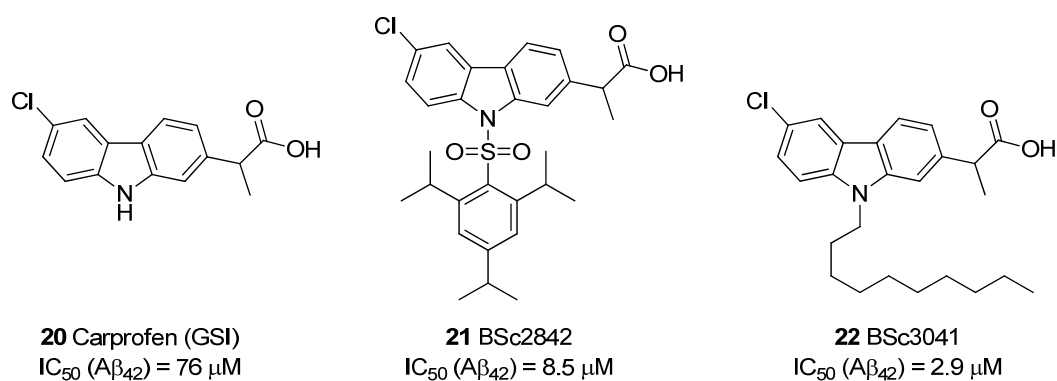


Abbildung 12: Strukturformeln und IC_{50} -Werte von Carprofen **20** und davon abgeleiteten GSMs.⁷⁹

Auch Carprofen-ähnliche Derivate auf dem Grundgerüst des Carbazols **23**, beispielsweise BSc3032 **24**, zeigten gute Aktivitäten (Abbildung 13). Neben dem lipophilen Rest wird, wie auch schon andere Arbeitsgruppen beobachtet haben, die funktionelle Einheit der Carbonsäure als essentiell angesehen. Eine Interaktion dieser Carbonsäure-Funktion mit einem Lysin-Rest (evtl. L624)⁸⁰ des APP könnte für die Aktivität dieser Substanzen gegenüber der γ -Sekretase verantwortlich sein.^{28, 79-83}

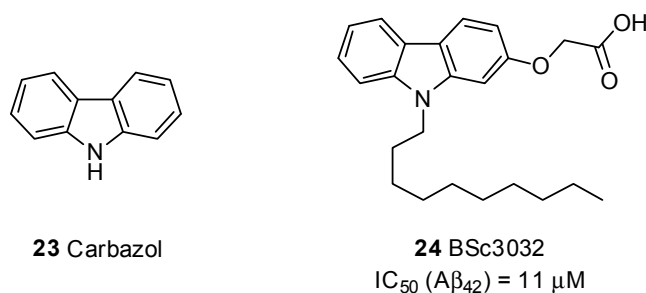


Abbildung 13: Strukturformeln und IC_{50} -Werte von Carbazol **23** und davon abgeleiteten GSM **24**.⁸¹

Neben den klassischen GSM wurden auch einige Substanzen entdeckt, die eine inverse Modulation bewirken. Diese inversen- γ -Sekretase-Modulatoren (iGSMs) erhöhen die $A\beta_{42}$ -Konzentration und vermindern die Bildung von $A\beta_{38}$. Häufig sind es strukturell sehr ähnliche Substanzen zu den GSM, die aber typischerweise keine Säurefunktion aufweisen.^{84, 85}

Sowohl die Bindungsstellen als auch die eigentliche mechanistische Funktion der GSM werden noch kontrovers diskutiert. So gibt es Anhaltspunkte, dass einige Modulatoren an APP binden und so ihre Wirkung induzieren, aber auch unterschiedliche Bindungsstellen an beiden Presenilinfragmenten oder Pen-2 wurden postuliert. Im Hinblick auf das mechanistische Verständnis der Modulation bleiben weitere Forschungsergebnisse abzuwarten.⁸⁴

Dieser Abschnitt kann nur einen kleinen Ausschnitt der Arbeiten zu GSMs darstellen. Es wurden inzwischen mehr als 80 Patente publiziert und die Anzahl der entwickelten GSMs ist nur schwer überschaubar. Dadurch wird auch die Bedeutung von der γ -Sekretase als potentielles Target und die Entwicklung von GSMs als mögliche Therapeutika zur Behandlung von AD-Patienten deutlich.

1.3. DYRK1A

1.3.1. Einleitung, Aufbau und Funktion

Die Proteinkinase DYRK1A, deren Abkürzung für *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase-1A* steht, ist eine von fünf Mitgliedern einer Kinasefamilie.^{86, 87} Die eukaryotische Familie wird der CMCG-Kinasegruppe untergeordnet, zu der mitunter auch die Glykogen Synthase Kinasen 3 (GSKs-3), die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), die Cdc2-like Kinasen (CLKs) und die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) gehören.⁸⁸ Die DYRK-Kinasen sind nach ihrer Fähigkeit benannt, sowohl Serin- und Threonin-Reste in den entsprechenden Substraten zu phosphorylieren als auch eine Selbstaktivierung aufgrund von Autophosphorylierung herbeizuführen. Diese Autophosphorylierung erfolgt am Tyrosinrest 321 (Y321), der in dem aktiven Proteinzentrum, der sogenannten *activation loop*, lokalisiert ist.⁸⁹ Ausgelöst durch die Phosphorylierung an Y321 tritt eine Reaktionskaskade in Kraft, die zu einer Konformationsänderung des Proteins in einen aktiven Zustand führt. Die konstitutive Autophosphorylierung erfolgt während oder direkt nach der Translation und wird als einmalige irreversible Aktivierung des Enzyms angesehen.⁹⁰

Die Substratphosphorylierung durch DYRK1A ist graphisch in Abbildung 14 dargestellt. Von Adenosintriphosphat (ATP) wird mit Hilfe von DYRK1A ein γ -Phosphatrest auf ein Substrat mit exponiertem Serin- oder Threonin-Baustein übertragen, wobei Adenosindiphosphat (ADP) entsteht. Hierbei folgt DYRK1A, wie viele andere Kinasen, einem zwei-Substrat Mechanismus.⁹¹

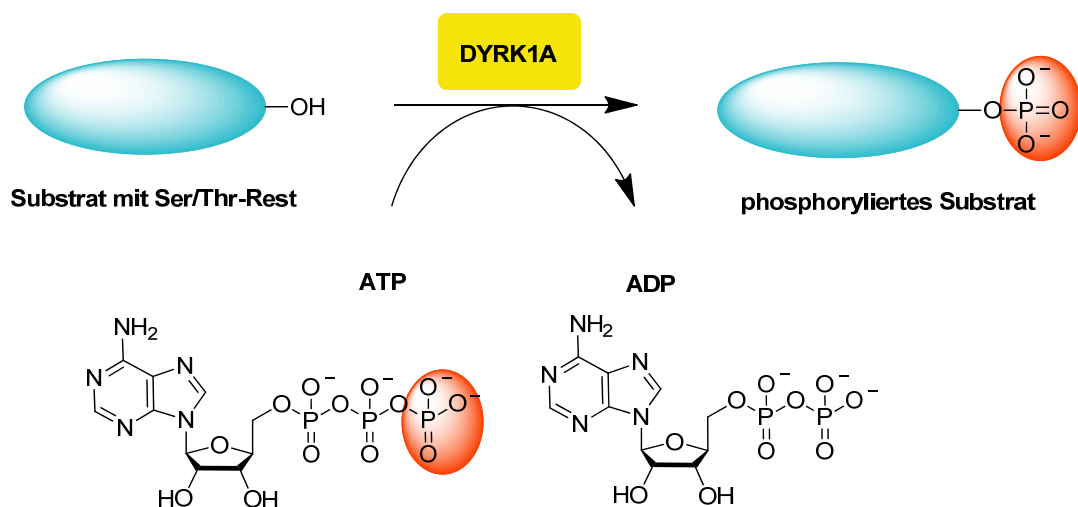


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Substratphosphorylierung durch DYRK1A.⁹²

Darüber hinaus beschränkt sich die Ähnlichkeit der DYRK-Subtypen überwiegend auf die Sequenz der zentralen Kinasedomäne. In den Bereichen der *N*- und *C*-Termini treten teils deutliche Unterschiede auf. Die Prolin-gerichtete Kinase DYRK1A besteht aus 763 Aminosäuren, die in mehrere Domänen untergliedert sind. Der *N*-Terminus beinhaltet ein Kernlokalisierungssignal (NLS-*nuclear localization signal*), welchem die Kinasedomäne folgt. Daran angeschlossen ist eine Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threonin-reiche Domäne (PEST), die für den Proteinabbau zuständig ist. In dem *C*-Terminus sind eine 13-konsequente-Histidin-Wiederholung (His) und eine Serin-/Threonin-reiche Region (S/T) enthalten (Abbildung 15).⁹³



Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Domänenstruktur von DYRK1A. NLS = Nuclear Lokalisations Signal, KINASE = Kinasedomäne, PEST = (Pro, Glu, Ser, Thr)-reiche Domäne, His = 13-konsequente-Histidin-Wiederholung, S/T = (Ser, Thr)-reiche Region.⁹³

Ogawa *et al.* publizierte in 2010 zwei röntgenkristallographische Analysen der Proteinstruktur von DYRK1A jeweils im Komplex mit unterschiedlichen Inhibitoren. Ein Komplex aus humanen DYRK1A mit dem DYRK1A-Inhibitor Harmin **25** wurde kristallisiert und strukturbestimmt (Abbildung 16, PDB: 3ANR).⁹⁴

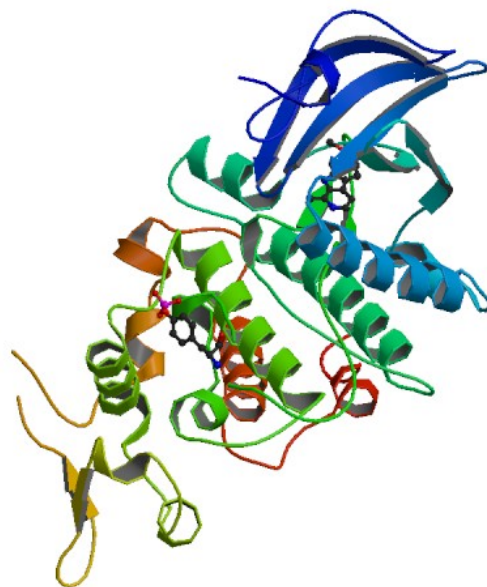


Abbildung 16: Proteinstruktur von humanen DYRK1A/Harmin **25**-Komplex. PDB: 3ANR.⁹⁴

Harmin **25** ist in der ATP-Bindetasche lokalisiert, wobei Wechselwirkungen mit Leucin 241 (Leu241) und Lysin 188 (Lys188) ausgebildet werden (Abbildung 17). Zusätzlich wurde ein humaner DYRK1A/INDY **26**-Komplex kokristallisiert und analysiert (PDB:3ANQ).⁹⁴

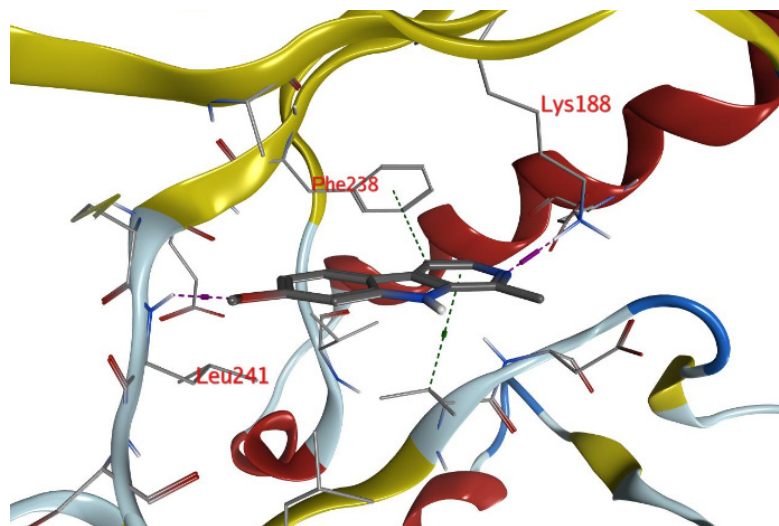


Abbildung 17: Lokalisation von Harmin **25** in der ATP-Bindungstasche von DYRK1A. Harmin **25** ist in grau und Interaktionen zwischen Harmin **25** und DYRK1A sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Verwendete Software: MOE.⁹⁴

Das DYRK1A-Gen ist das einzige der fünf Familienmitglieder, das auf dem humanen Chromosom 21 innerhalb der sogenannten *Down syndrome critical region* (DSCR) liegt. Aufgrund der Lage wird DYRK1A als Auslöser für einige Symptome des Down-Syndroms, wie mentale und motorische Einschränkungen angesehen. Ebenso konnte ein Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen gezeigt werden.^{93, 95, 96}

Untersuchungen zur Lokalisation von DYRK1A ergaben eine ubiquitäre Expression, sowohl in embryonalem als auch adultem Gewebe. Eine erhöhte Expression konnte im Menschen im Kleinhirn, Hippocampus und Riechkolben beobachtet werden.⁹³

Obwohl das im Aufbau enthaltene Kernlokalisierungssignal und die 13-konsequente-Histidin-Wiederholung (His) auf einen Aufenthaltsbereich im Zellkern hindeuten, wurde DYRK1A ebenfalls im Zellsoma und den Dendriten von Neuronen gefunden.^{93, 97-100}

Basierend auf den unterschiedlichen Aufenthaltsorten der Proteinkinase, sowohl in diversen Gewebearten als auch in mehreren Zellkompartimenten, ist es nicht verwunderlich, dass eine hohe Anzahl an Substraten aus verschiedensten Proteinklassen von DYRK1A phosphoryliert werden. Zu den Substraten gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren (z. B.: CREB, STAT3, p53, NFAT), Splicingfaktoren (z. B.: SF2, SF3, Cyclin L2), synaptische Proteine

(z. B.: Dynamin I, Synaptojanin I), sowie einige mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziierte Proteine (Tau, APP, α -Synuclein). Anhand der unterschiedlichsten Substrate wird die pleiotrope Funktion von DYRK1A in einer Vielzahl von zellulären Vorgängen deutlich.⁹³

1.3.2. DYRK1A als potentielles therapeutisches Target zur Behandlung von AD

Die Proteinkinase DYRK1A wird mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Dazu zählen neben dem Down-Syndrom (DS) auch zahlreiche neurodegenerative Erkrankungen wie zum Beispiel die Alzheimer-Demenz (AD), Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington und Pick-Krankheit.^{93, 95, 101, 102}

Der Kontext mit Symptomen des Down-Syndroms scheint, aufgrund der Lage des DYRK1A-Gens auf Chromosom 21 in der DSCR und der durch Trisomie 21 hervorgerufene 1,5-fach erhöhte Expression der Kinase, naheliegend. Trisomie 21 führt zu einem frühzeitigen Altern der betroffenen Personen. Wenn die Patienten älter als 40 Jahre werden, entwickeln nahezu alle EOAD-artige Pathologien, wie NFTs und β -Amyloidosen. Neben den Zusammenhängen von DYRK1A mit dem DS ist die Beziehung zur AD am häufigsten erforscht.¹⁰³ In einer Untersuchung von Chromosom 21 in Hinblick auf die Beurteilung von genetischen Verbindungen mit AD, die an 374 japanischen Alzheimer-Demenz Patienten und 375 Kontrollen durchgeführt wurde, konnte das DYRK1A-Gen als bedeutendster genetischer Risikofaktor identifiziert werden.¹⁰⁴

Ferrer *et al.* fanden erhöhte DYRK1A Immunoreaktivität im Zytoplasma und Nukleus von Nervenzellen des Neocortex, entorhinalen Cortex und Hippocampus in DS, AD und Pick-Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an DYRK1A-positiven Kernen im Frontallappen in Proben von AD-Patienten um ein Zwanzigfaches erhöht war, im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollgruppen.⁹⁵

Im Jahre 2007 konnte erstmals ein Zusammenhang von DYRK1A und Tau hergestellt werden. Im Mausmodell (TG-Maus) wurde entdeckt, dass DYRK1A die Tau-Aminosäurereste Ser 202, Thr 212 und Ser 404 phosphoryliert, welches als Hinweis für die physiologische Funktion von DYRK1A in der Tau-Hyperphosphorylierung gesehen wurde.¹⁰⁵ Diese Tau-Modifikation ist für die Formation von NFTs in AD notwendig. Bis heute wurden mindestens 11 Serin- und Threoninreste in Tau bestätigt, die direkt von DYRK1A phosphoryliert werden können. Einige dieser Reste liegen auch in Tau-Aggregaten von NFTs phosphoryliert vor, wobei noch unklar ist welche und wie viele dieser Phosphorylierungen von Tau als Antriebskraft zur Akkumulation von NFTs notwendig sind. Zusätzlich wird durch die Phosphorylierung von Tau

an Threonin 212 durch DYRK1A die weitere Phosphorylierung durch GSK-3 β *in vitro* begünstigt, welches zu einer erhöhten Bildung von NFTs führt.^{96, 106, 107}

Ein weiteres Substrat von DYRK1A ist der *alternative splicing factor* (ASF). Dieser wird an drei verschiedenen Serinresten phosphoryliert, wodurch dessen Fähigkeit zur Regulation von Tau-Splicing deaktiviert und eine Tau Aggregation erleichtert wird.¹⁰⁸

Zusätzlich führt *in vitro* eine Überexpression von DYRK1A zu einer vermehrten Phosphorylierung an Threonin 668 in APP. *In vivo* konnte eine Korrelation zwischen erhöhter DYRK1A-Menge und gesteigerten PhosphoAPP- und A β -Leveln beobachtet werden. Dieses könnte eine potentielle Verbindung zwischen DYRK1A und APP sowie damit verbunden AD-Symptomen darstellen.¹⁰⁹

Eine Phosphorylierung von PS1, einer Untereinheit der γ -Sekretase, an Threonin 354 durch DYRK1A *in vitro* und in kultivierten Zellen führt zu einer gesteigerten Proteaseaktivität. Dadurch kommt es zu einer erhöhten A β_{40} - und A β_{42} -Bildung, welche zu einer mit AD assoziierten A β -Plaque Formation führen kann.¹¹⁰

In Neuroblastomzellen konnte eine von A β induzierte Zunahme der DYRK1A-Transkription und eine damit verbundene Erhöhung von Tau-Phosphorylierungen beobachtet werden. Durch diesen Feedback-Mechanismus gilt DYRK1A als Verbindungstück zwischen β -Amyloid-Produktion und der Phosphorylierung von Tau in AD.¹⁰⁴

Basierend auf den genannten Zusammenhängen mit den Charakteristiken von Alzheimer-Demenz erscheint DYRK1A als ein vielversprechendes Target zur Entwicklung von Inhibitoren zur klinischen Behandlung von AD.

1.3.3. DYRK1A-Inhibitoren

Die Entwicklung von Inhibitoren der Proteinkinase DYRK1A ist ein relativ neues Forschungsgebiet, in dem in den letzten Jahren, aufgrund des vielversprechenden klinischen Potenzials, zahlreiche Bemühungen unternommen wurden. Inzwischen sind einige DYRK1A-Inhibitoren bekannt, die teilweise eine Aktivität bis in den nanomolaren Bereich aufweisen.

Mit einer der am häufigsten genannten Inhibitoren ist Harmin **25**, welcher wie bereits beschrieben mit humanen DYRK1A kokristallisiert wurde.⁹⁴ Es ist ein natürlich in verschiedenen Pflanzen vorkommendes β -Carbolin, welches z. B. aus den Samen der Steppenraute *Peganum harmala* oder der südamerikanischen Lianenart *Banisteriopsis caapi* isoliert wurde.¹¹¹⁻¹¹³ Neben Harmin **25** sind meist noch zahlreiche andere Vertreter der β -Carboline, wie Harmalin **27**, Harmol **28** und Tetrahydroharmin **29**, enthalten.¹¹⁴ Je nach

Assaybedingungen und ATP-Konzentration wurden für die mittlere inhibitorische Konzentration für Harmin **25** Werte zwischen 33 nM¹¹⁵ und 700 nM¹⁰⁷ veröffentlicht.

Neben der Analyse der Proteinstruktur des DYRK1A/Harmin **25**-Komplexes, die Hinweise auf Interaktionen des β -Carbolins **25** mit Resten in der ATP-Bindungstasche gibt, konnte anhand von kinetischen Studien gezeigt werden, dass Harmin **25** ein ATP-kompetitiver Inhibitor von DYRK1A ist (Abbildung 18).⁹¹

Basierend auf einem Screening mit 69 Kinasen konnte gezeigt werden, dass Harmin **25** eine hohe Selektivität gegenüber DYRK1A ($IC_{50}(\text{DYRK1A}) = 80 \text{ nM}$) aufweist. Bis auf die verwandten Kinasen DYRK2 ($IC_{50}(\text{DYRK2}) = 900 \text{ nM}$) und DYRK3 ($IC_{50}(\text{DYRK3}) = 800 \text{ nM}$), die um zehnfach schwächer inhibiert wurden, wurden keine weiteren Kinasen deutlich beeinflusst.^{115, 116} Wechselwirkungen mit nicht enthaltenen Kinasen können natürlich nicht ausgeschlossen werden. So ist bekannt, dass die Monoaminoxidase A (MAO-A, $K_i = 5 \text{ nM}$) von Harmin **25** reversibel gehemmt wird. Bis heute wird Harmin **25** als einer der potentesten und oral bioverfügbaren DYRK1A-Inhibitoren angesehen, der allerdings zahlreiche Nebeneffekte aufweist, wodurch die klinische Anwendbarkeit stark eingeschränkt wird.⁹⁶

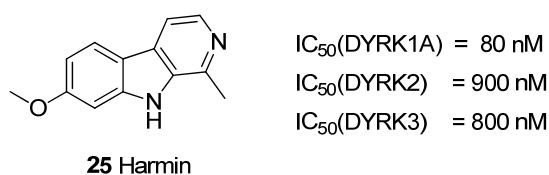
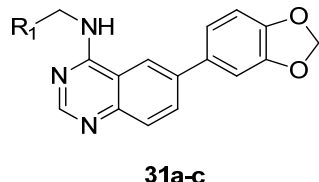
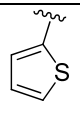
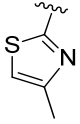



Abbildung 18: Strukturformel und IC_{50} -Werte für Harmin **25**. [ATP] = 50 μM .¹¹⁶

Ein weiterer natürlich vorkommender hoch potenter Inhibitor von DYRK1A ist Staurosporin **30** ($IC_{50}(\text{DYRK1A}) = 19 \text{ nM}$). Das als sekundärer Metabolit von Bakterien produzierte Staurosporin **30** ist ein glykosyliertes Indolocarbazol. Allerdings ist Staurosporin **30** dafür bekannt zahlreiche Kinasen zu inhibieren, weshalb es meist als Kontrollsubstanz in biologischen Assays eingesetzt wird. Durchgeführte Derivatisierungsversuche an Staurosporin **30** führten zu einigen sehr aktiven DYRK1A-Inhibitoren, die ähnlich zur Leitstruktur wenig selektiv sind.¹¹⁷

Rosenthal *et al.* haben im Jahre 2011 mehr als 50 Chinazolinderivate als Kinaseinhibitoren vorgestellt, von denen einige hohe inhibitorische Aktivitäten gegenüber DYRK1A besitzen. Allerdings sind die meisten Derivate wenig selektiv und hemmen ebenfalls die verwandten Cdc2-like-Kinasen (CLK1-4). Drei Beispiele sind in Tabelle 1, mit den entsprechenden IC_{50} -Werten für DYRK1A und CLK4, aufgeführt.¹¹⁸

Tabelle 1: Strukturformeln und IC₅₀-Werte für Chinazolinderivate **31a-c** als DYRK1A-Inhibitoren.¹¹⁸

	Substanz	R ¹	IC ₅₀ (DYRK1A) ^a	IC ₅₀ (CLK4) ^a
			[nM]	[nM]
 <p>31a-c</p>	31a		62	39
	31b		26	37
	31c		17	70

^a [ATP] = 10 μM.

Ein Benzothiazol-abgeleitetes Derivat ist das durch ein *high-throughput*-Screening identifizierte INDY **26**. Das zu dem bekannten CLK-Inhibitor TG003 **32** verwandte INDY **26** ist ein DYRK/CLK-dualer Inhibitor (IC₅₀(DYRK1A) = 240 nM), mit einer fast dreifach erhöhten Aktivität bezüglich DYRK1A (Abbildung 19).⁹⁴

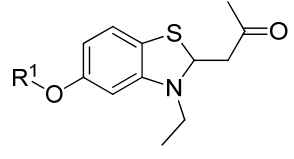
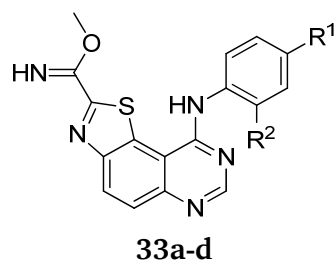
 <p>26/32</p>	26 INDY	R ¹ = H	IC ₅₀ (DYRK1A) = 240 nM IC ₅₀ (DYRK1B) = 230 nM
	32 TG003	R ¹ = CH ₃	IC ₅₀ (DYRK1A) = 930 nM IC ₅₀ (CLK1) = 119 nM IC ₅₀ (CLK4) = 30 nM

Abbildung 19: Strukturformeln und IC₅₀-Werte für die DYRK1A-Inhibitoren INDY **26** und TG003 **32**. [ATP] = 10 μM.⁹⁴

Anfang 2013 wurden 67 tricyclische Pyrimidinderivate beschrieben, von denen einige DYRK1A sehr stark inhibieren (Tabelle 2). Ebenfalls wird die Aktivität der Derivate gegenüber DYRK2 aufgeführt, die teilweise bis zu dreifach schwächer ist als die Wirkung auf DYRK1A. Jedoch werden beide Kinasen von einigen Derivaten ähnlich stark inhibiert. Da die Derivate nicht gegenüber anderen Kinasen evaluiert wurden, kann keine Aussage über die Selektivität getroffen werden.¹¹⁹

Tabelle 2: Strukturformeln und IC₅₀-Werte für vier tricyclische Pyrimidinderivate **33a-d** als DYRK-Inhibitoren.¹¹⁹



Substanz	R ¹	R ²	IC ₅₀ (DYRK1A) [nM]	IC ₅₀ (DYRK2) [nM]
33a	Cl	H	1.13	4.74
33b	CH ₃	H	0.98	2.83
33c	Br	F	0.16	0.24
33d	Cl	Cl	0.22	0.28

Die hier näher beschriebenen DYRK1A-Inhibitoren sind einige Beispiele von vielen verschiedenen Strukturklassen. Weitere als DYRK1A-Inhibitoren veröffentlichte Struktur motive sind die Aristolactamderivate¹²⁰, sowohl natürlich vorkommende, als auch synthetische Polyphenole^{116, 121, 122}, Pyrazolidin-3,5-dione¹²³, Indirubinderivate¹²⁴, Meridianinderivate¹²⁵, Pyridin- und Pyrazinderivate¹²⁶, sowie viele mehr.

1.4. Carbazole und Aza-Analoga in der medizinischen Forschung

1.4.1. Carbazole und Aza-Analoga als privilegierte Leitstrukturen

In den vorherigen Kapiteln 1.2.3 und 1.3.3 wurden bereits einige Inhibitoren und Modulatoren vorgestellt, die auf einem Carbazolgrundgerüst oder einem verwandten Aza-Analogen, auch Carbolin genannt, beruhen. Auf dieser Basis soll im Folgenden das Carbazol **23** und entsprechende Analoga als privilegierte Leitstrukturen in der Wirkstoffentwicklung herausgestellt werden.

Seit Charkraborty *et al.* in 1965 die Isolation des ersten Carbazol-Alkaloids Murrayanin **34** aus *murraya koenigii* (Currybaum), welches eine antibiotische Aktivität aufweist, publiziert haben, wurden zahlreiche weitere biologisch aktive Alkaloide gefunden (Abbildung 20).^{127, 128} Da natürlich vorkommende Substanzen häufig als Leitstruktur für die Entwicklung neuer, potenterer und selektiverer Wirkstoffe dienen, bildet das Carbazolgrundgerüst die zentrale Struktureinheit in vielen Forschungsansätzen. Hierbei konnten Carbazolderivaten verschiedenste pharmakologischen Eigenschaften zugeordnet werden. So wirken sie z. B. gegen Krebs, antimikrobiell, antiviral, entzündungshemmend oder als Antioxidant.¹²⁸⁻¹³¹ Carprofen **20** als COX2-Inhibitor, der für die Behandlung von Tieren zugelassen ist, und zusätzlich die γ -Sekretase schwach hemmt wurde bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben.^{78, 79} Durch Derivatisierungen des Grundgerüsts von Carprofen **20** und von Carbazol **23** konnten einige potente Modulatoren und Inhibitoren der γ -Sekretase identifiziert werden.^{79, 81, 82}

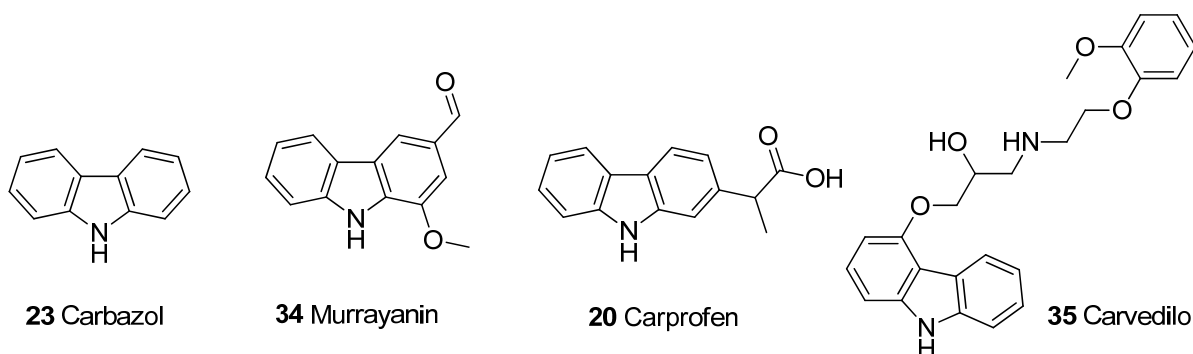


Abbildung 20: Strukturformeln von Carbazol **23**, Murrayanin **34**, Carprofen **20** und Carvedilol **35**.^{128, 130}

Carvedilol **35** ist ein chirales Carbazolderivat, welches als Medikament zur Blutdrucksenkung zugelassen ist. **35** hemmt β -Adrenozeptoren und wirkt zusätzlich als Antioxidant gegenüber Eisenionen-induzierten Oxidationen (Abbildung 20).¹³²

In 2013 wurden von Zhu *et al.* einige Carbazolderivate auf ihre Eigenschaft als neuroprotektives Agens mit potentiell anti-oxidativer Wirkung untersucht. Da erhöhter oxidativer Stress mit vielen neurologischen Erkrankungen wie beispielweise AD in Verbindung gebracht wird, stellt die Entwicklung von Antioxidantien eine potentielle Strategie zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. Gegenstand der Veröffentlichung waren hauptsächlich Substitutionen an der N-H-Position von Carbazol **23**. Das potenteste Derivat **36** ist sterische relativ groß und unpolar (Abbildung 21).¹³⁰

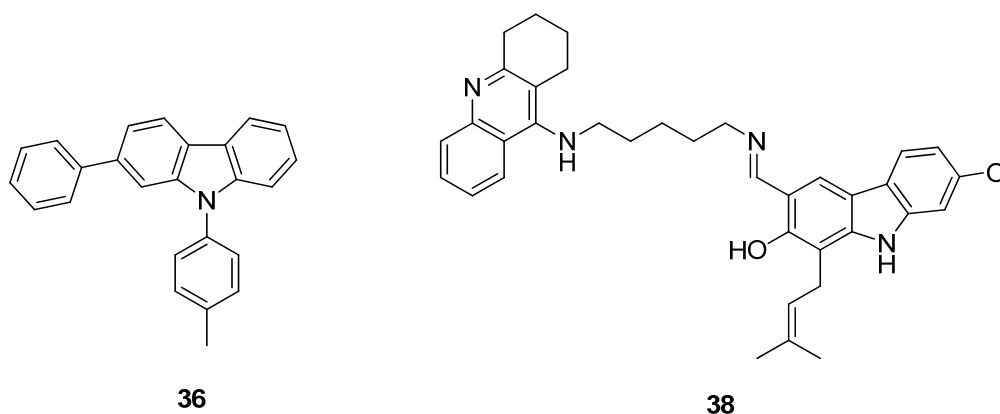


Abbildung 21: Strukturformeln vom Antioxidant **36** und Tacrin-Carbazol-Hybrid **38**.^{130, 133}

Tacrin **37** war der erste Cholinesterase-Hemmer (ChE-Hemmer) der zur Behandlung von AD zugelassen wurde. Allerdings musste das Medikament **37** aufgrund von Nebeneffekten in Form von Schädigungen der Leber wieder vom Markt genommen werden. Eine aktuelle Untersuchung von Tacrin-Carbazol-Hybriden als multifunktionelle Wirkstoffe gegen AD offenbarte mehrere potente Carbazolderivate. Bei dem in Bezug auf die antioxidative Wirkung als Radikalfänger ($IC_{50}(\text{ABTS-Assay}) = 8.3 \mu\text{M}$) und Inhibition von AChE ($IC_{50}(\text{AChE}) = 0.5 \mu\text{M}$) besten Agens **38**, handelt es sich um ein von 7-Methoxyheptaphyllin **39** abgeleitetes Derivat **38** (Abbildung 21). Zusätzlich zeigte **38** neuroprotektive Effekte gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst sowohl von Wasserstoffperoxid als auch von $A\beta_{42}$ -Toxizität. Die Evaluation der potentesten Substanz **38** im *in vivo*-Mausmodell zeigte eine Verbesserung der Gedächtnisleistung, welche zuvor durch Applikation von Scopolamin **40** verursacht wurden.¹³³

Eine weitere Studie zu multifunktionellen Carbazolderivaten identifizierte Wirkstoffe, die einerseits als Fluorophore von $A\beta$ agieren und andererseits die $A\beta$ -Fibrillogenese hemmen sollten. Als Carbazol-basierte Cyanin-Fluorophore binden diese Derivate selektiv an $A\beta_{40}$ -Peptide, -Aggregate und -Plaques, wodurch die Fluoreszenz deutlich verstärkt wird. Somit ist eine direkte Färbung und Lokalisation dieses pathologischen Merkmals von AD

möglich. Einer der untersuchten Fluorophore, SLOH **40**, inhibiert die Fibrillogenes von A β ₄₀ und zeigt neuroprotektive Eigenschaften gegenüber der von A β ₄₀ induzierten Zytotoxizität auf neuronale Zellen. Ergänzend hierzu wurde die Fähigkeit von SLOH **40**, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, demonstriert (Abbildung 22).

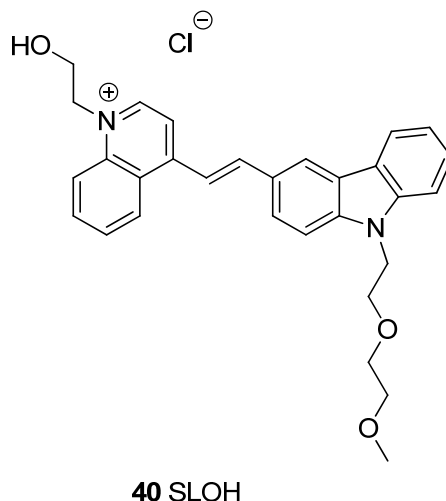


Abbildung 22: Strukturformel des multifunktionellen Carbazol-Fluorophores SLOH **40**.¹³⁴

Neben den Carbazol-basierten γ -Sekretase-Modulatoren und -Inhibitoren konnten auch BACE1-Inhibitoren identifiziert werden, die ein Carbazolgrundgerüst aufweisen. Die Inhibition von BACE1 beeinflusst ähnlich der Hemmung der γ -Sekretase den amyloidogenen Weg des APP-Metabolismus. Somit ist die Entwicklung neuer BACE1-Inhibitoren eine weitere Strategie, die zu verbesserten Behandlungsmöglichkeiten von AD führen könnte. In einem Screening von 121 Substanzen wurde von Bandgar *et al.* unter anderem die Substanz E7T18 **41** als aktiver Inhibitor von BACE1 ($IC_{50}(\text{BACE1}) = 4.93 \mu\text{M}$) ermittelt. Optimierung durch Evaluation der besten Bindungslängen des verbindenden 1,3-disubstituierten-2-Propanols und des zweiten Substituenten lieferte den Wirkstoff **42**, der BACE1 ($IC_{50}(\text{BACE1}) = 0.71 \mu\text{M}$) im nanomolaren Bereich inhibiert und daneben eine gute Selektivität aufweist. So wird Cathepsin D mehr als 400-fach schwächer beeinflusst. Zusätzlich deuten berechnete Werte auf eine gute Permeabilität von **42** über die Blut-Hirn-Schranke (Abbildung 23).¹²⁹

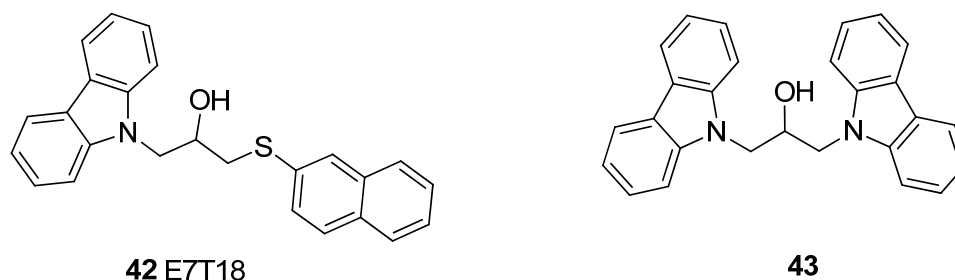


Abbildung 23: Strukturformeln der Carbazol-basierten BACE1-Inhibitoren E7T18 **42** und **43**.¹³⁵

Eine Gruppe von Aza-Analoga der Carbazolderivate, die über einen Pyridinring anstelle eines Benzols verfügen, werden Carboline genannt. Dabei wird abhängig von der Position des Pyridin-Stickstoffs im tricyclischen Grundgerüst nach α -Carbolinen **44**, β -Carbolinen **45**, γ -Carbolinen **46** und δ -Carbolinen **47** unterschieden (Abbildung 24).¹³⁶

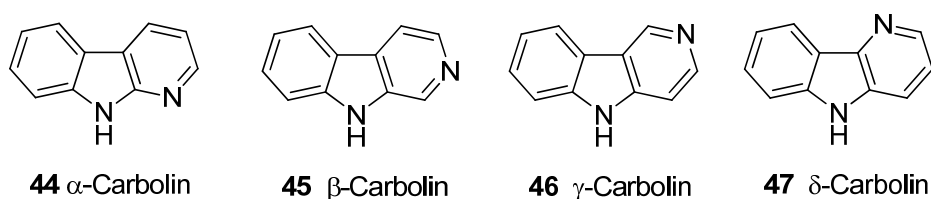


Abbildung 24: Nomenklatur der Carboline **44-47**.¹³⁶

Carboline, sind natürlich vorkommende Alkaloide, denen ebenfalls zahlreiche pharmakologisch interessante Eigenschaften zugesprochen werden. Dazu gehören entzündungshemmende und antifungale Wirkung, Zytotoxizität gegenüber Krebszellen und Stimulierung des zentralen Nervensystems.¹³⁷⁻¹⁴⁰

Von den Carbolinen, sind die β -Carboline **45** am besten untersucht. Mit Harmin **25** wurde bereits ein DYRK1A-inhibierendes β -Carbolin-Derivat in Kapitel 1.3.3 vorgestellt. Eine weitere Kinase, die ebenfalls als Target für Medikamente gegen AD gilt, ist GSK3 β . In 2012 haben Wang *et al.* einige α -Carbolin-basierte GSK3 β -Inhibitoren synthetisiert und auf ihre inhibitorischen Aktivität untersucht. Das Derivat **48** mit der stärksten Aktivität in der Untersuchung ist in Abbildung 25 dargestellt.¹³⁷

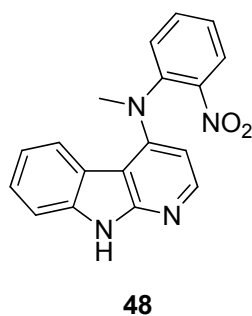


Abbildung 25: Strukturformel des GSK3β-Inhibitors **48**.¹³⁷

Immer wieder werden Carboline als Cytostatika untersucht. In 2012 wurden fünf neue Carbolin-basierte Alkaloide aus *Stellaria Dichotoma* var. *Lanceolata* isoliert, von denen Dichotomin B **49** eine zytotoxische Aktivität gegenüber der humanen Krebszelllinie SMMC-7721 ($IC_{50}(\text{SMMC-7721}) = 85.4 \mu\text{M}$) aufweist (Abbildung 26).¹³⁸ In einer weiteren Studie wurden synthetisierte 3-Phenyl-4-substituierte-β-Carboline bezüglich der Aktivität gegenüber der Proliferation von drei Tumorzelllinien: HeLa, MCF-7 und A549, untersucht. Zwei der aktivsten Derivate **50** und **51** sind in Abbildung 26 gezeigt. Beide Carboline **50** und **51** hemmen die Proliferation der drei Zelllinien mit IC_{50} -Werten im Bereich von $8\text{--}55 \mu\text{M}$.¹³⁹

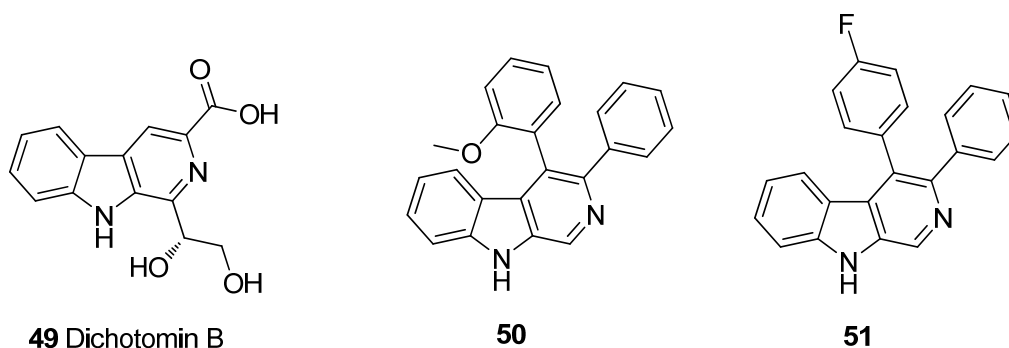


Abbildung 26: Strukturformeln von drei zytotoxischen Carbolinderivaten Dichotomin B **49**, **50** und **51**.^{138, 139}

Des Weiteren wurden natürliche und synthetische Carboline hinsichtlich ihres Potentials als Anti-Malaria-Wirkstoff evaluiert. So konnten einige Derivate ermittelt werden, die hohe antiplasmodiale Aktivitäten besitzen. So weist das natürlich vorkommende Tubulosin **52** einen IC_{50} von 24 nM auf, aber keinerlei Selektivität im Vergleich zur Zytotoxizität gegenüber humanen Zellen. Dagegenüber zeigt das später entdeckte Dihydrousambarensin **53** ebenfalls eine antiplasmodiale Aktivität im nanomolaren Bereich ($IC_{50}(P. falciparum) = 32 \text{ nM}$) und zusätzlich eine um das 375-fache reduzierte Zytotoxizität auf. Die beiden Derivate **52** und **53**

basieren auf der Grundstruktur eines teilweise hydrierten β -Carbolins. Auch Derivate mit geringerer molarer Masse, wie das synthetische Methyl- δ -carbolin **54**, hemmen die Zellproliferation des Malaria-Erregers potent ($IC_{50} = 1500 \text{ nM}$) und weisen eine gute Selektivität (Selektivitätsindex >100) auf (Abbildung 27).¹⁴¹

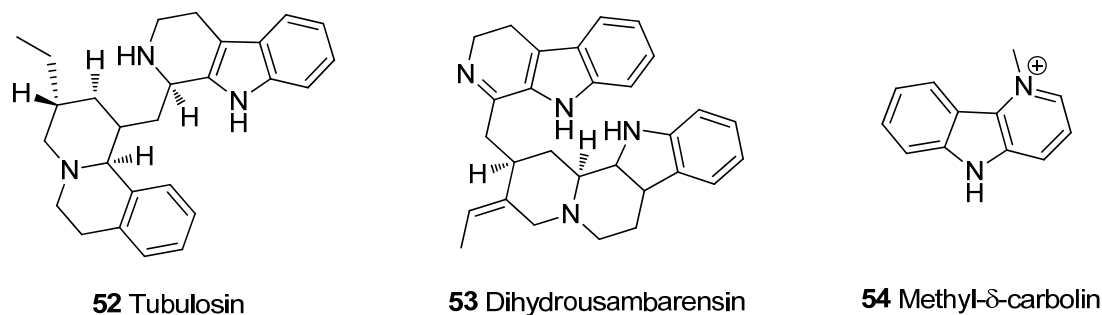


Abbildung 27: Strukturformeln dreier Carbolinderivate mit Anti-Malaria-Aktivität: Tubulosin **52**, Dihydrousambarensin **53** und Methyl- δ -carbolin **54**.

Die in diesem Abschnitt erläuterten Beispiele für Carbazole und Carboline, dem Aza-Analogon, verdeutlichen den breiten Anwendungsbereich der Leitstruktur in der medizinischen Forschung und stellen gleichzeitig nur einen kleinen Auszug der potentiellen Verwendungen dar. Allerdings führt die Möglichkeit, eine Leitstruktur für verschiedene Targets zu benutzen, auch zur Problematik einer potentiell eingeschränkten Selektivität, welche im Folgenden genauer beschrieben wird.

1.4.1. Eine Leitstruktur viele Anwendungen: Die Problematik der Selektivität

Dass das Carbazolgrundgerüst, auch in Form von Analoga, für die Entwicklung neuer Medikamente gegenüber verschiedensten Erkrankungen, Symptomen und Targets verwendet wird, birgt neben der Gewinnung potentiell aktiver Wirkstoffe gleichzeitig das Risiko einer verminderten Selektivität dieser Substanzen, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können.

Dieses Problem soll im Hinblick auf das natürlich vorkommende β -Carbolin Harmin **25** verdeutlicht werden.

In Kapitel 1.3.3 wurde Harmin **25** als DYRK1A-Inhibitor mit einer Aktivität im nanomolaren Bereich ($IC_{50}(\text{DYRK1A}) = 33 \text{ nM}$)¹¹⁵ vorgestellt, der eine gute Selektivität gegenüber 69 Kinasen aufweist. So werden die verwandten Kinasen DYRK2 und DYRK3 um weniger als ein

Zehntel inhibiert. Allerdings kann basierend auf dem Kinasen-Screening keine umfassende Aussage über die Selektivität getroffen werden. So ist bekannt, dass Harmin MAO-A koinhibiert, was zu nicht tolerierbaren Nebeneffekten in der klinischen Anwendung führen würde.^{96, 115, 116} MAO-A reguliert unter anderem die Konzentration von Serotonin und Noradrenalin im zentralen Nervensystem. Bei Hemmung des Enzyms oder genetischer Mutation, z. B. im Brunner-Syndrom, kommt es zu ausgeprägtem aggressiven Verhalten und mentaler Retardierung.^{142, 143}

Zusätzlich zu DYRK1A und MAO-A inhibiert Harmin **25** auch CDK1 ($IC_{50}(CDK1) = 18 \text{ nM}$)¹⁴⁴, CDK2 ($IC_{50}(CDK2) = 35 \text{ nM}$)¹⁴⁴ und CDK5 ($IC_{50}(CDK2) = 21 \text{ nM}$)¹⁴⁴, welche den Zellteilungszyklus regulieren. Die Kinasen werden sowohl mit Krebsentstehung als auch mit der Hyperphosphorylierung von Tau in Verbindung gebracht. Diese Koinhibition sollte aber im Gegensatz zu der von MAO-A keine gravierend nachteiligen Effekte verursachen.¹⁴⁴

Zusätzlich weist Harmin **25** anti-mikrobale, -plasmodiale, -fungale, -oxidative, -tumorale, -mutagene, zytotoxische und halluzinogene Eigenschaften auf.¹¹¹ So konnte in einer Untersuchung der antiviralen Aktivität gegenüber dem Tabakmosaikvirus und der fungizidalen Wirkung auf 14 Pilzarten gezeigt werden, dass Harmin **25** ein gutes Virostatikum und moderates Fungizid ist.¹⁴⁵

Harmins **25** zytotoxische Eigenschaft führt zur Evaluation des Wirkstoffes als Anti-Tumor-Medikament. In einer Publikation zur Wirkung von **25** auf Magenkrebs wurde beschrieben, dass die Proliferation, Migration, Invasion und induzierte Apoptose der Magenkrebs-Zellen *in vitro*, genauso wie das Tumorwachstum *in vivo* gehemmt werden.¹⁴⁶ In Hepatokarzinomzellen (HepG2) wird durch Harmin **25** Apoptose induziert und die Chemosensitivität gegenüber den Zytostatika 5-Fluoruracil **55** und Cisplatin **56** erhöht.¹⁴⁷

In einer Studie von Siemens Medical Solutions USA, Inc., die zu einer Patentanmeldung geführt hat, wurden Carbolinderivate auf ihre Affinität zu Tau und A β -Peptiden als potentielle Marker für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) untersucht. Dabei wurde auch die Wirkung der Derivate auf MAO-A evaluiert, da ein PET-Ligand für die Früherkennung von Alzheimer-Erkrankungen, ähnlich der nachteiligen Koinhibition von MAO-A bei DYRK1A-Inhibitoren, keine Nebeneffekte wie das zusätzliche Imaging von MAO-A aufweisen darf. Die synthetisierten Derivate beinhalten auch von Harmin **25**-abgeleitete Wirkstoffe, wie z. B. T660 **57**, welcher keine Affinität gegenüber Tau zeigt, aber an A β bindet. Das T687 **58** Derivat wirkt als sehr guter Tau-Ligand und mäßiger A β -Ligand. Das optimierte γ -Carbolin T807 **59** weist in Bezug auf PHF-Tau eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich auf, während A β um zehnfach schwächer gebunden wird. Dadurch wird eine selektive Identifizierung von PHF-Tau ermöglicht. Zusätzlich erfüllt T807 **59** wichtige

pharmakokinetische Eigenschaften, wodurch es einen vielversprechenden Kandidaten zur klinischen Anwendung darstellt. Dieser Tau-Indikator wird zurzeit in AD-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht (Abbildung 28).^{148, 149}

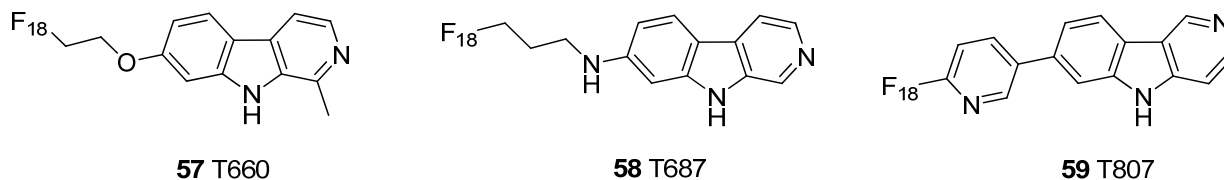


Abbildung 28: Strukturformeln dreier von Siemens Medical Solutions USA, Inc. evaluierten PET-Liganden **57**, **58** und **59**.

Die vorangegangenen Darstellungen haben nur einige Beispiele der Targets von Harmin oder verwandten Derivaten aufgezeigt. Bereits anhand dieser konnte aber die Problematik der Entwicklung selektiver Wirkstoffe hinlänglich verdeutlicht werden.

1.4.2. Synthese von Carbazolen und Carbolinen

Carbazole

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, sind das Carbazolgrundgerüst und dessen Analoga wichtige Leitstrukturen der medizinischen Forschung. Da aber die Menge der Alkaloide aus natürlichen Quellen häufig sehr gering ist und manche Derivatisierungen nicht direkt an den substituierten Grundgerüsten vorgenommen werden können, ist die Entwicklung entsprechender Synthesemethoden zur Darstellung dieser Substanzen eine wichtige Aufgabe der chemischen Forschung.^{128, 150, 151}

Inzwischen sind unzählige Reaktionssequenzen bekannt und regelmäßig kommen neue hinzu. Einige der Möglichkeiten zur Darstellung von Carbazolderivaten sollen nachstehend vorgestellt werden.

Der wahrscheinlich einfachste Weg zum Aufbau des Grundgerüsts ist der Ringschluss des Pyrrolrings ausgehend von Biphenylen oder Diarylaminen.

Die Synthese von Carbazolderivaten auf Basis eines *o*-Nitrobiphenylderivats **60** mit Triethylphosphit unter reduktiver Zyklisierung wurde von Cadogan *et al.* untersucht.¹⁵² In Abbildung 29 ist die Methode als Bestandteil der Totalsynthese von (±)-Mahanimbin **61** abgebildet. Zuerst wurde aus den Edukten 2-Nitrobrombenzol **62a** und 4-Brom-2-methylanisol **62b** über eine Ullmann-Kupplung das Biphenyl **60** dargestellt. Bei der Ullmann-

Reaktion wird ein Biphenyl **60** aus zwei halogenierten Vorläufern mit Kupfer als Katalysator und unter Wärmezufuhr aufgebaut. Bei dem anschließenden Pyrrolringschluss unter Verwendung von Triäthylphosphit wurde ein Substanzgemisch aus dem Hauptprodukt **63a** und dem Nebenprodukt **63b** erhalten. Das Primärprodukt **63a** wurde in zwei weiteren Stufen zum (\pm)-Mahanimbin **61** umgesetzt.^{128, 153}

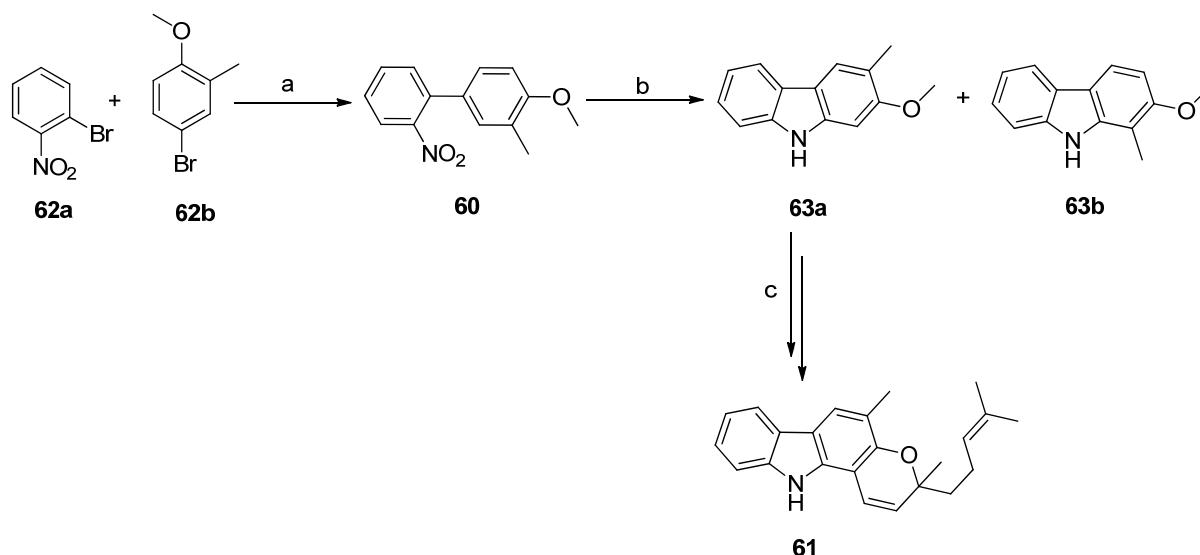


Abbildung 29: Aufbau des Carbazolgrundgerüst über Biphenyle **60** anhand der Synthese von (\pm)-Mahanimbin **61**. (a) Ullmann-Kupplung, 10 % Ausbeute (b) $\text{P}(\text{OEt})_3$, Rückfluss, 45 % Ausbeute, (c) Etherspaltung: HBr/HOAc , 90 % Ausbeute, Kondensation: Citral, Pyridin, Rückfluss, 35 % Ausbeute.¹⁵³

Die klassische Methode zur Darstellung von Diarylaminen **64** für den Aufbau des Pyrrolrings ist die Ullmann-Goldberg-Kupplung (Abbildung 30a). Dabei werden Acetaniline **65a** und Brombenzole **65b** unter kontinuierlicher Hydrolyse der Acetamidfunktion zu Diarylaminen **64** umgesetzt.^{127, 154-157}

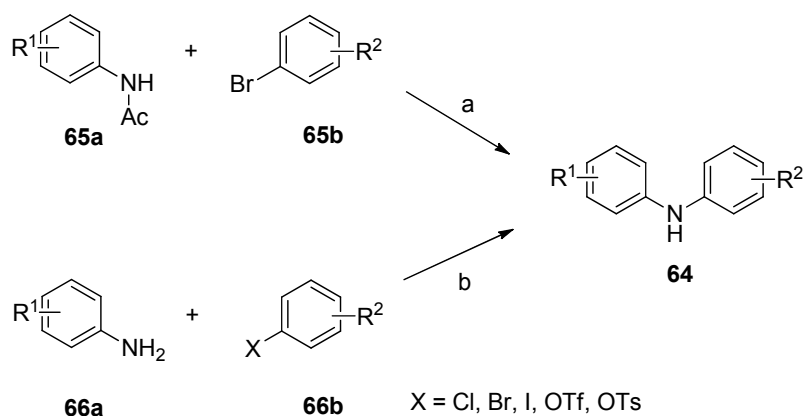


Abbildung 30: Synthesemethoden zur Darstellung von Diarylaminen. (a) Ullmann-Goldberg-Kupplung: 1. Cu, K_2CO_3 , Pyridin, 2. 20 % KOH, Ethanol. (b) Buchwald-Hartwig-Aminierung: Pd-Katalysator, Ligand, Base, Lösungsmittel.¹²⁷

Die heute bevorzugte Variante ist die Palladium(0)-katalysierte Buchwald-Hartwig-Aminierung, bei der Aniline **66a** und Benzolderivate **66b** mit guter Abgangsgruppe, wie z. B. Bromid, Chlorid, Triflat und Tosylat, gekuppelt werden (Abbildung 30b). Die Vorteile dieser Methode sind die milden Bedingungen, der Einsatz katalytischer Mengen des Übergangmetalls und die teilweise sehr guten Ausbeuten.^{127, 158-160}

Die C-C-Verknüpfung der Diarylamine **64** zu Carbazolen **67** kann über eine Palladium(II)-vermittelte oxidative Zyklisierung erfolgen (Abbildung 31). Dies ist insofern vorteilhaft, als dass viele verschiedene funktionelle Gruppen toleriert werden. Allerdings waren anfangs stöchiometrische Mengen Palladium(II)acetat notwendig, was sehr kostenintensiv ist.¹⁶¹ Die Weiterentwicklung der Synthesemethode ergab, dass katalytisch eingesetztes Palladium(II) durch Zugabe von Kupfer(II)acetat reoxidiert werden kann. Danach wurden noch verschiedene andere Ko-Oxidationsmittel identifiziert, so dass der Ringschluss inzwischen mit geringeren Kosten durchgeführt werden kann.^{127, 162-164}

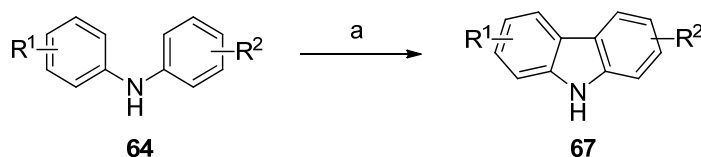


Abbildung 31: Zyklisierung zum Carbazol **67**. (a) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (katalytische Menge), $\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4$, Essigsäure, Rückfluss.¹²⁷

Eine weitere Methode zur Darstellung von Carbazolderivaten ist die Fischer-Borsche-Synthese, mit dessen Hilfe zahlreiche Carbazolalkaloide erstellt wurden (Abbildung 32). Dabei handelt es sich um eine Kondensationsreaktion von Cyclohexanon **68a** mit Phenylhydrazinen **68b**. Das entstehende Arylhydrazon **69a** bildet ein Indolmotiv aus, welches wiederum zu

1, 2, 3, 4-Tetrahydrocarbazolen **69b** führt. Dieser Reaktionsschritt umfasst eine Protonierung, C-C-Bindungsbildung über eine [3, 3]-sigmatrope Umlagerung und Eliminierung von Ammoniak. Das Tetrahydrocarbazol **69b** kann anschließend zum entsprechenden Carbazolderivat **70** dehydriert werden, wobei z. B. Chloranil oder Palladium auf Aktivkohle als Reagenz für die Aromatisierung eingesetzt werden können.^{127, 165, 166}

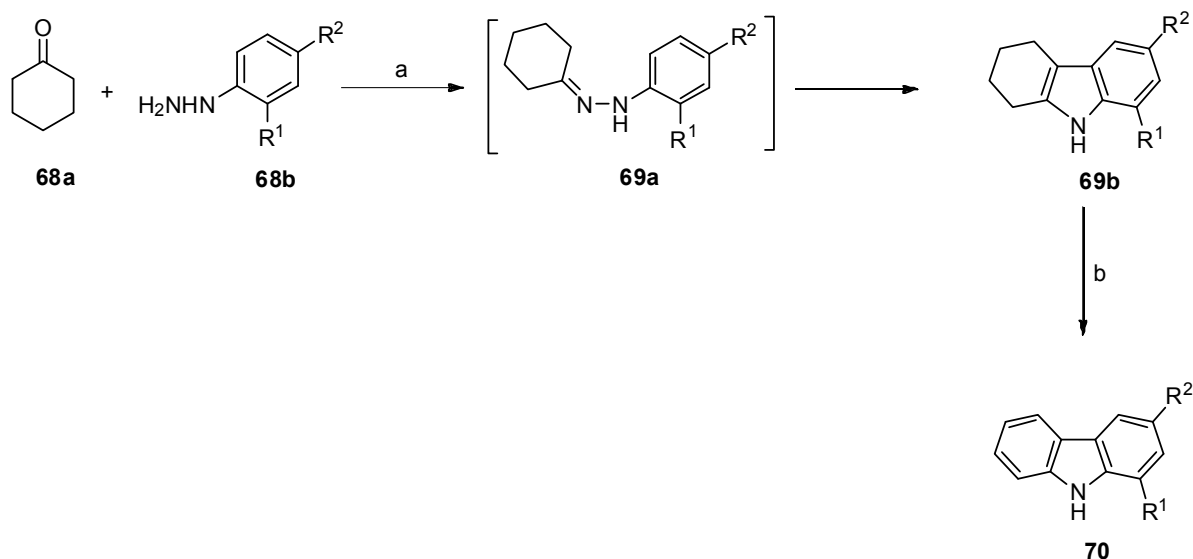


Abbildung 32: Fischer–Borsche-Synthese zur Darstellung von Carbazolen. (a) Wässrige Essigsäure, Rückfluss. (b) Chloranil oder Pd/C.¹²⁷

Die hier vorgestellten Synthesebeispiele stellen lediglich einen kleinen Ausschnitt der entwickelten Methoden zur Darstellung von Carbazolderivaten dar.

Carboline

In diesem Abschnitt werden einige Methoden zur Darstellung von Carbolinen anhand von Synthesebeispielen beschrieben. Häufig können hierbei mit den erforderlichen Startmaterialien auch die Carboline mit anderen Pyridinpositionen erhalten werden.

Die klassische Methode zum Aufbau von β -Carbolinen ist die Pictet-Spengler-Reaktion, welche β -Arylethylamine, wie z. B. Tryptaminderivate **71a**, mit den entsprechenden Aldehyden **71b** zum Tetrahydro- β -carbolin **72a** umgesetzt. Die Reaktion wird meist Säure-katalysiert und unter Hitzezufuhr durchgeführt, wobei Wasser abgespalten wird. Dies stellt eine Variante der Mannich-Reaktion da. Die anschließende Oxidation liefert dann den vollständig konjugierten Tricyclus **72b** (Abbildung 33).^{167, 168}

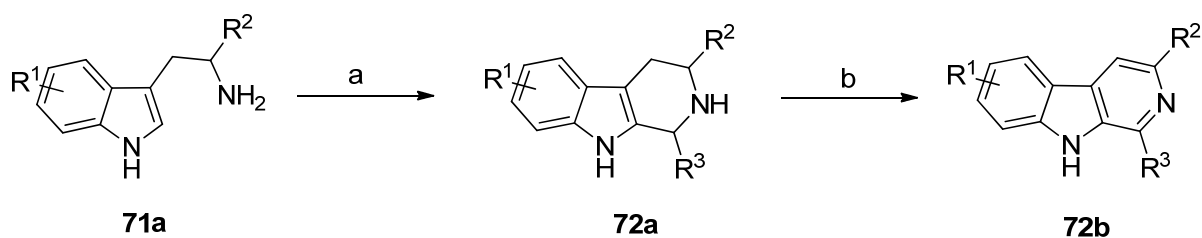


Abbildung 33: Pictet-Spengler-Reaktion zur Darstellung von β -Carbolinen **72b**. (a) $R^3\text{COH}$ **71b**, Säure, Hitzezufuhr. (b) Oxidationsmittel.²⁰

In einer Variation der Pictet-Spengler-Reaktion wird Tryptophan **73a** als Startmaterial eingesetzt. Dabei werden substituierte 3-Carbonsäure-1, 2, 3, 4-Tetrahydro- β -carboline **73b** erhalten, die ebenfalls durch Oxidation zu den entsprechenden β -Carbolinderivaten **73c** umgesetzt werden können (Abbildung 34).¹⁶⁹

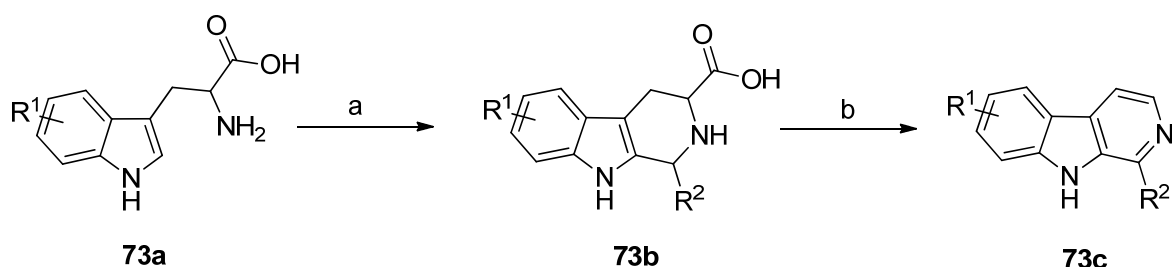


Abbildung 34: Variation der Pictet-Spengler-Reaktion zur Darstellung von β -Carbolinen **73c**. (a) $R^1\text{CHO}$, Essigsäure, Rückfluss, 3h. (b) Essigsäure, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, NaHSO_3 , NaOH , 100°C , 20 min.¹⁶⁹

Weitere Methoden, die auf dem Aufbau des Pyrrolrings basieren, sind denen der Carbazole ähnlich. So können z. B. α -Carbolin **74a** und γ -Carbolin **74b** aus 3-(2-Azidphenyl)pyridin **74c** durch thermale Zersetzung der Azidfunktion über eine Graebe-Ullmann-Reaktion, die auch zum Aufbau von Carbazolen genutzt wird, erhalten werden.^{136, 170}

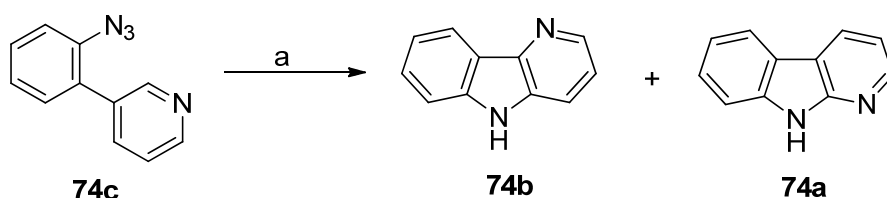


Abbildung 35: Graebe-Ullmann-Reaktion zur Darstellung von α -Carbolin **74a** und γ -Carbolin **74b**. (a) Decalin, $170\text{--}180^\circ\text{C}$.^{136, 170}

Auch der zweite Weg über ein Diarylamin zum Aufbau des Pyrrolrings der Carbazole kann auf die Synthese von Carbolinderivaten übertragen werden. Ausgehend vom *N,N*-Phenyl-

pyridinaminderivaten können abhängig von der Position des Stickstoffs im Pyridinring alle Carbolingrundgerüste erhalten werden. Wird 2-Anilinpyridin **75a** bestrahlt, kann α -Carbolin **75b** in einer guten Ausbeute von 81 % erhalten werden (Abbildung 36).^{136, 171}

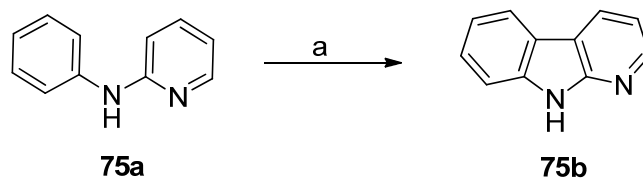


Abbildung 36: Darstellung von α -Carbolin **75b** durch Bestrahlung des Diarylamins **75a**. (a) $h\nu$.^{136, 171}

Auch die Palladium-katalysierte Aminierung samt anschließendem Pyrol-Ringschluss wurde für den Aufbau von Carbolinen benutzt. Dieses ist anhand der Darstellung eines β -Carbolinderivats **76** in Abbildung 37 gezeigt. Dabei wird zuerst ein substituiertes Anilin **77a** mit einem bromierten Pyridinderivat **77b** zu einem Diarylamin **78** gekuppelt, welches danach oxidativ zum Carbolinderivat **76** umgesetzt wird.^{136, 172}

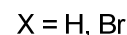
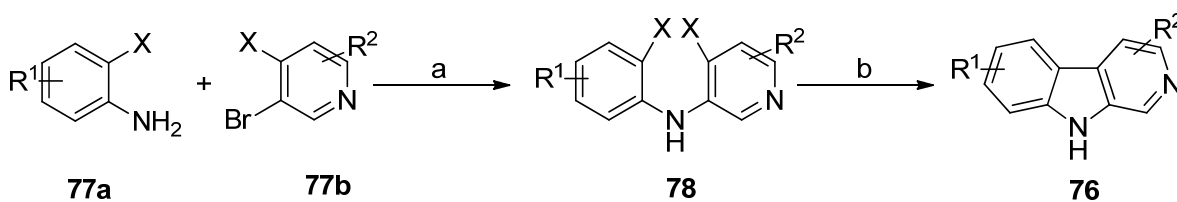


Abbildung 37: Palladium-katalysierter Aufbau vom β -Carbolinderivat **76**. (a) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen, Natrium-*tert*-Butanolat, Toluol, 100 °C. (b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Natriumcarbonat, DMF, Rückfluss.^{136, 172}

Analog zur Fischer-Borsche-Synthese der Carbazole können ausgehend von Piperidonderivaten **79a**, hydrierte Carboline **80a** dargestellt werden. Aus diesen können wiederum mittels Aromatisierung, die bereits in der Pictet-Spengler-Reaktion vorgestellt wurde, die entsprechenden Carboline **80b** erhalten werden. In Abbildung 38 ist als Beispiel die Umsetzung von 4-Piperidon **79a** mit einem substituierten Arylhydrazon **79b** zum γ -Carbolin **80b** gezeigt.^{136, 173}

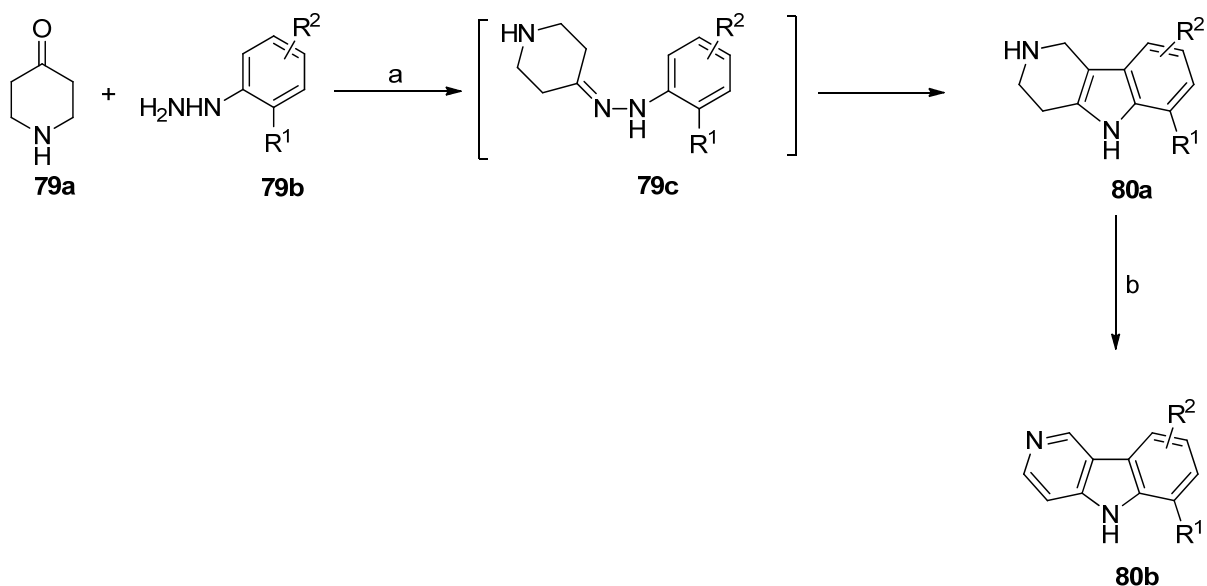


Abbildung 38: Fischer-Reaktion zur Darstellung von γ -Carbolinen **80b**. (a) Salzsäure, Ethanol. (b) 10 % Pd/C, Decalin.^{136, 173}

Eine Variation dieser Fischer-Synthese ist die Reaktion von Cyclohexanon **81a** mit Pyridylhydrazonen **81b**, woraus ebenfalls über ein hydriertes Zwischenprodukt **81c** Carbolinderivate **82** erhalten werden. Wird beispielsweise 3-Pyridylhydrazon **81b** eingesetzt so entsteht eine Mischung aus β -Carbolin **82a** und δ -Carbolin **82b** (Abbildung 39).

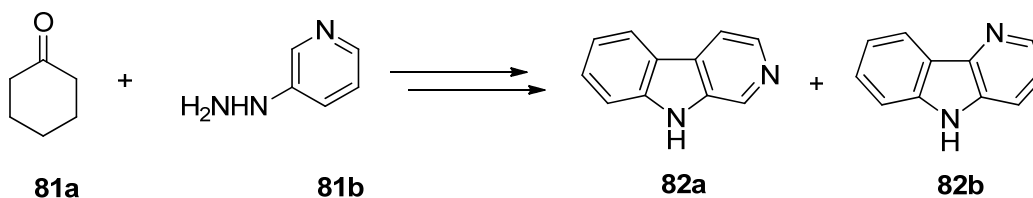


Abbildung 39: Fischer-Reaktion zur Darstellung von β -Carbolin **82a** und δ -Carbolin **82b**.

Die in diesem Abschnitt erläuterten Synthesebeispiele stellen, wie bereits oben erwähnt, nur einen kleinen Ausschnitt der publizierten Methoden zum Aufbau von Carbolinen dar. Insgesamt sollte auf die Ähnlichkeit dieser Methoden zu denen für die Darstellung von Carbazolderivaten verwiesen werden.

1.5. ADAM10

1.5.1. Einleitung

Die Metalloprotease ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase 10*) gehört zur ADAM-Gruppe, von der bisher 21 humane Mitglieder bekannt sind. Von den im humanen Genom vorkommenden ADAM-Genen kodieren nur 12 Vertreter Proteine, die eine katalytisch aktive Funktion aufweisen. Den als katalytisch-inaktiv eingestuften Mitgliedern fehlt die für die Proteolyse wichtige Zink-Bindungstasche.^{174, 175}

Eine Unterklasse der Zinkproteasen ist die Metzinkin-Familie, zu welcher neben den ADAMs auch die Astacine und MMPs (Matrix-Metalloproteasen) gehören. Zusammen mit den verwandten SVMPs (*snake venom metalloproteinases*) und den ADAMTS (*ADAMs containing thrombospondin motifs*) bilden die ADAMs die Unterfamilie der Adamalysine.¹⁷⁶

Die Bezeichnung ADAMs beruht auf deren Funktionalität sowohl als Interaktionspartner von Integrin als auch als Sheddase. Als Sheddasen werden Enzyme bezeichnet, welche die Ektodomänen von zahlreichen membrangebundenen Proteinen proteolytisch abspalten. Basierend auf beiden Funktionen können die ADAMs die Zelloberfläche verändern und in Zellinteraktionen eingreifen, wodurch sie viele biologische Prozesse beeinflussen. Zu den physiologischen Aufgaben gehören die Regulation von Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration und -kommunikation. Allerdings können auch einige Substrate der ADAMs pathologische Prozesse auslösen, zu denen z. B. Entzündungsreaktionen und Tumorentwicklung gehören.^{175, 177, 178}

ADAM10 ist auch unter den Namen MDAM (*mammalian disintegrin-metalloprotease*) und Kuzbanian bekannt.¹⁷⁶ Häufig wird ADAM10 mit der α -Sekretase gleichgesetzt, die APP im nicht-amyloiden Weg prozessiert (siehe Kapitel 1.1.3), welches nur bedingt richtig ist. So konnten insgesamt drei Metalloproteasen – ADAM9, ADAM10 und ADAM17 – direkt oder indirekt mit der Aktivität der α -Sekretase in Verbindung gebracht werden. Von diesen erscheint allerdings, basierend auf aktuellen Untersuchungen an primären neuronalen Zellkulturen, ADAM10 der vielversprechendste Kandidat für die α -Sekretase zu sein.¹⁷⁸

Die Protease ADAM10 wird in zahlreichen Geweben und peripheren Strukturen sowie im humanen Zentralnervensystems (ZNS) exprimiert. Im adulten Gehirn konnte ADAM10-mRNA weit verteilt in nahezu allen Bereichen nachgewiesen werden, wobei die Menge an mRNA im Kleinhirn, das die Motorik steuert, am höchsten war.¹⁷⁹⁻¹⁸²

Die ADAMs werden in den Zellen im endoplasmatischen Retikulum gebildet und zur weiteren Reifung in den Golgi-Apparat transportiert. Dort wird das Protein glykosyliert und die

Prodomäne zur Aktivierung abgespalten. Basierend hierauf ist es nachvollziehbar, dass die meisten ADAMs im Golgi-Apparat enthalten sind. Zu einem geringeren Anteil sind die ADAMs auch in der Zellmembran lokalisiert. Während zahlreiche physiologische Prozesse, in die ADAMs involviert sind, sehr genau untersucht und verstanden sind, ist wenig über die genauen intrazellulären Lokalisations- und Transportvorgänge bekannt.¹⁷⁶

Das ADAM10-Gen ist im menschlichen Organismus auf Chromosom 15 und im murinen Chromosomensatz auf Chromosom 9 lokalisiert.^{183, 184}

1.5.2. Aufbau

Bei ADAM10 handelt es sich um ein Typ I integrales Transmembranprotein, welches aus sechs Untereinheiten aufgebaut ist. Ausgehend vom extrazellulären N-Terminus bildet die Prodomäne (Pro) die erste Einheit, gefolgt von der katalytischen Metalloprotease-Domäne (MP). Daran angeschlossen sind eine Disintegrin- und eine Cystein-reiche-Domäne (Dis, bzw. Cys). Mit der Transmembrandomäne (TMD) ist eine verhältnismäßig kurze zytoplasmatische Domäne (Z) verknüpft (Abbildung 40).¹⁷⁵

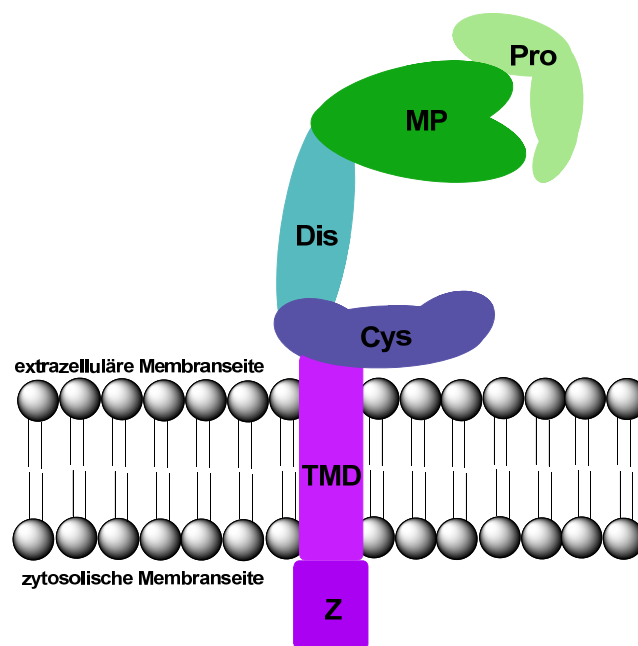


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Aufbaus von ADAM10. Pro = Prodomäne, MP = Metalloprotease-Domäne, Dis = Disintegrin-Domäne, Cys = Cystein-reiche-Domäne, TMD = Transmembrandomäne, Z = zytoplasmatische Domäne.^{175, 176, 179, 185}

Die schematische Darstellung des Aufbaus in Abbildung 40 beruht auf der kristallographischen Analyse der MP/Dis/Cys-region von VAP1 (*vascular apoptosis-inducing protein-1*), welches das in Schlangengift enthaltene Homolog von Säugetier-ADAMs darstellt. Bemerkenswert ist, dass die Protease eine C-Form einnimmt, wodurch eine Interaktion der weiter auseinander liegenden Domänen ermöglicht werden könnte.¹⁸⁶

Der Aufbau der einzelnen ADAM-Mitglieder ist sehr ähnlich, wobei die meisten ADAMs bis auf ADAM10 und ADAM17 eine *epidermal growth factor-like*-Domäne aufweisen.¹⁷⁵

Die Mitglieder der Metzinkin-Familie haben eine wichtige gemeinsame Eigenschaft; sie werden als inaktive Enzymvorstufen, sogenannte Zymogene, gebildet. Durch Synthese von nicht aktiven Proteinvorläufern können proteolytische Aktivitäten sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert werden, wodurch vorzeitige Enzymaktivität und Abbau verhindert werden können. Im Falle von ADAM10 wird die ursprüngliche, inaktive Form als proADAM10 bezeichnet. Diese Form wird durch einen „Cystein-switch“-Mechanismus beibehalten, in dem ein Cysteinrest der Prodomäne an das, im aktiven Zentrum lokalisierte, Zinkatom bindet. Die Aktivierung von ADAM10 erfolgt auf Basis einer proteolytischen Spaltung der Prodomänen durch Proproteinkonvertasen, wie z. B. Proproteinkonvertase-7 (PC7) oder Furin.¹⁸⁷ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch isolierte Prodomänen von ADAM10 die reife Enzymform selektiv inhibieren.¹⁸⁸ Neben der Funktion der ADAM10-Prodomäne in der eigenen Enzyminhibition fungiert diese auch als intramolekulares Chaperon, und beeinflusst somit die richtige Proteinfaltung, weshalb es für die Enzymreifung unerlässlich ist.¹⁷⁹

Die Metalloprotease-Domäne weist eine kugelförmige Struktur auf, die aus zwei Untereinheiten besteht. Die Spalte zwischen den Untereinheiten stellt die eigentlich aktive Tasche dar, in der auch das katalytische Zinkatom enthalten ist, welches von drei Histidinen (His) koordiniert wird.¹⁷⁵ Für die Bindung des Zinks ist eine konservierte Aminosäure-Sequenz verantwortlich, die für ADAM10 wie folgt aufgebaut ist: HEVGHNFGSPHD.¹⁷⁹ Die proteolytische Aktivität der ADAMs beruht auf einer Zink-vermittelten hydrolytischen Prozessierung der Substrate (Abbildung 41).¹⁷⁶

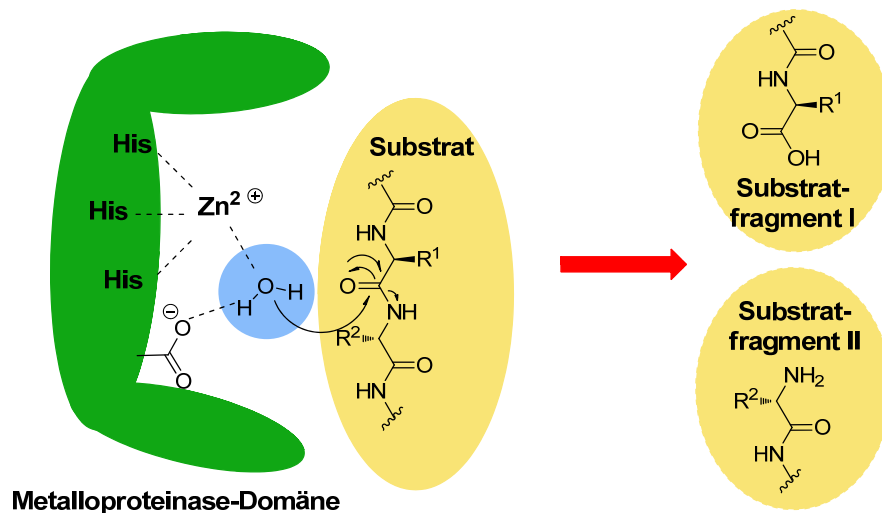


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Zink-vermittelten Proteolyse eines Substrats durch eine Metalloprotease.¹⁸⁹

Die Disintegrin- und Cystein-reiche-Domäne weisen viele gemeinsame Aufgaben auf oder unterstützen einander in der entsprechenden Funktion. So konnte gezeigt werden, dass ein Substrat an die Cystein-reiche-Domäne gebunden wird, woraufhin die Disintegrin-Domäne die Metalloprotease-Domäne für eine effektive enzymatische Spaltung positioniert.¹⁹⁰ *In vivo* Studien mit chimärer ADAM10/13-Domänenstruktur lieferten Hinweise auf eine durch die Cystein-reiche-Domäne beeinflusste Regulation der Proteolyseaktivität.¹⁹¹ Untersuchungen an ADAM17 konnten einen Einfluss der Cystein-reiche-Domäne auf die Abspaltung der Prodomäne herausstellen.¹⁹² Die in allen ADAMs vorkommende Disintegrin-Domäne bindet an Integrine, die als Transmembranproteine in der Zelladhäsion, -migration und -kommunikation eine wichtige Rolle einnehmen. Eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion konnte mit dieser Domäne in Verbindung gebracht werden. Zwar konnte dieser Zusammenhang bisher an elf verschiedenen ADAMs nachgewiesen werden, allerdings noch nicht für ADAM10.^{193, 194}

Die zytoplasmatische Domäne reguliert die Funktion der Proteinase durch Modulation der Reifung, der Aktivität und des intrazellulären Transports des Proteins.¹⁷⁶ Die Domäne weist zwei Prolin-reiche Bindungsstellen für Proteine mit Src-Homologie-3 (SH3) -Domäne auf.¹⁷⁹ Ein Beispiel für ein Protein mit SH3-Domäne, dass mit dem zytoplasmatischen Teil von ADAM10 interagiert, ist *synapse associated protein-97* (SAP97), welches die genaue Orientierung von ADAM10 in synaptischen Membranen und damit die α -Sekretaseaktivität beeinflusst.^{176, 195} Auch eine Calcium-unabhängige Bindungsstelle für Calmodulin wurde in der intrazellulären Domäne identifiziert, wodurch die Reifung der Proteinase gehemmt wird.¹⁹⁶

1.5.3. Substrate und Funktionen von ADAM10

Bis heute sind zahlreiche Substrate und damit verbundene Funktion von ADAM10 bekannt, deren Zahl weiterhin zunimmt. Neben den essentiellen Funktionen gibt es auch einige, die zu teils gravierenden Erkrankungen führen können.¹⁷⁷

Ein ADAM10-Mangel in Mäusen führt zum Absterben der Embryonen nach spätestens 9,5 Tagen embryonaler Entwicklung (E9.5) und ruft Entwicklungsstörungen im ZNS und Herzen hervor. Diese phänotypischen Merkmale gleichen denen von Mäusen, die keinen intakten Notch-Signalmetabolismus aufweisen. Daraus kann unter anderem auf eine Verbindung von ADAM10 mit Notch geschlossen werden, wie es in Kapitel 1.2.1 für die α -Sekretase beschrieben wurde. Neben der Embryonalentwicklung ist der durch ADAM10 beeinflusste Notch-Signalweg auch für die Neurogenese im adulten ZNS essentiell.^{177, 197}

Auch die Funktion von ADAM10 als α -Sekretase in der nicht-amyloiden Prozessierung von APP wurde bereits erläutert (siehe Kapitel 1.1.3). Zudem beeinflusst ADAM10 Ephrine und deren Rezeptoren im Gehirn, wodurch die Leitung, Zielfindung und Ausbreitung von Axonen gefördert wird.^{190, 198}

Ein weiteres Substrat von ADAM10 ist N-Cadherin, welches von der neuronalen Zelloberfläche abgetrennt wird. Dadurch wird die Zelladhäsionsfunktion in eine signalleitende Funktion verändert, was von hoher Bedeutung bei der von N-Cadherin vermittelten Genexpression ist.¹⁹⁹ Die Spaltung des *immunoglobulin superfamily recognition molecule* L1 ist ebenso ein Beispiel für die Funktion von ADAM10 im Gehirn. Hierdurch hat die Aktivität von ADAM10 auch Auswirkungen auf die neuronale Migration und das Wachstum von Neuritaussprossungen.^{200, 201}

Neben den zuvor genannten Substraten und damit verbundenen Funktionen im ZNS, die als physiologisch notwendig und gutartig angesehen werden, prozessiert ADAM10 auch einige Substrate, die mit Entzündungsreaktionen und Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Ein mit chronischen Entzündungsprozessen assoziiertes Substrat ist der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R), dessen Freisetzung mitunter durch ADAM10 die Bildung eines Rezeptor-Liganden-Komplexes mit dem Zytokin Interleukin-6 (IL-6) fördert. Dieser Komplex stimuliert das transmembrane Signaltransduktions-Glykoprotein gp130. Die damit verbundene Signalleitung führt zu entzündlichen Immunantworten.^{177, 202, 203}

Die Rekrutierung von Leukozyten zu entzündeten Stellen erfolgt über mehrere Stufen, wobei teilweise Interaktionen zwischen den Leukozyten und den Gefäßwänden involviert sind. Einige hiermit verbundene Zelladhäsionsmoleküle können sowohl an Zellen gebunden als auch in löslicher Form vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass in entzündlichen

Erkrankungen die lösliche Proteinvariante vermehrt ins Blut freigesetzt wird. Dieses kann je nach Zelladhäsionsmolekül z. B. durch die Aktivität von ADAM10 verursacht werden. Zu diesen Zelladhäsionsmolekülen gehören die Chemokine CX3CL1 und CXCL16, das *junctional adhesion molecule-A* (JAM-A) und das vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-Cadherin).¹⁷⁷

Es gibt Indizien, die für einen Zusammenhang von einer vermehrten Expression von ADAM10 und der Entstehung von verschiedenen Krebsarten sprechen.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Der Einfluss einiger ADAMs auf frühe Stadien der Tumorentstehung konnte bewiesen werden. Dabei spielen die ADAMs eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Proliferation durch freigesetzte Wachstumsfaktoren oder der Rettung der Tumorzellen vor Immunreaktionen.²⁰⁷

Zu den ADAM10-Substraten, die mit Krebs verknüpft sind, gehört z. B. die ErbB-Familie, welche aus vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen besteht. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) und andere EGF-ähnliche Liganden binden an diese Rezeptoren und aktivieren die ErbB-Rezeptor exprimierenden Zellen. Eine abnorme ErbB-Rezeptor-Aktivität, die beispielweise durch Überexpression oder Mutation des Rezeptors sowie erhöhte Ligandenbildung hervorgerufen wird, kann zur Ausbildung und zum Fortschreiten von Tumoren führen. Die zwei Liganden, EGF und Betacellulin, werden von ADAM10 von der Zellmembran abgespalten und können dadurch an die ErbB-Rezeptoren binden.^{196, 208, 209} Zusätzlich kann auch der ErbB-Rezeptor proteolytisch von ADAMs gespalten werden. Speziell ErbB2, auch als humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*) bezeichnet, wird von ADAM10 gespalten. Erhöhte Konzentrationen von ErbB2/HER2 im Serum von Brustkrebspatienten werden als negatives Indiz bezüglich Prognose und Therapieerfolg gewertet. Das verbliebene ErbB2-Fragment weist eine Kinaseaktivität auf und kann unabhängig von bindenden Liganden Wachstums- und Überlebenssignale an die Zelle übermitteln.²¹⁰⁻²¹²

Die Regulation von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen, Cadherinen und CD44 beeinflusst Bindung und Migration von Tumorzellen. Auch für diese Tumor-assoziierten Adhäsionsmoleküle konnten Zusammenhänge mit ADAM10 offenbart werden.¹⁷⁷

Die hier genannten Beispiele sind die wichtigsten und am besten untersuchten Substrate und Funktionen von ADAM10, aber durchaus nicht alle bekannten. Dennoch sollte dies die physiologische Wichtigkeit sowie pathologische Bedenklichkeit der Metalloprotease deutlich gemacht haben.

1.5.4. ADAM10 als Ziel von pharmakologischen Interventionen

Therapeutisches Potential

Die Aktivierung der α -Sekretase bzw. des damit in Verbindung gebrachten Enzyms ADAM10 galt lange als potentielle therapeutische Strategie zur Behandlung von AD. Durch eine gesteigerte APP-Prozessierung entlang des nicht-amyloiden Weges wird vermehrt das lösliche APP-Fragment (APPs α) gebildet, welches neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Gleichzeitig wird die Bildung der toxischen A β -Peptide vermindert. Allerdings hat sich herausgestellt, dass eine weitreichende Aktivierung der α -Sekretase nicht günstig ist, da auch die anderen zahlreichen Substrate beeinflusst werden, was zu nicht tolerierbaren Nebeneffekten führt. Demgegenüber könnte eine genau dosierte Kompensation der altersabhängig verminderten α -Sekretaseaktivität oder eine räumlich auf betroffene Gehirnareale begrenzte Aktivierung vorteilhaft sein. Einige Möglichkeiten zur Steigerung der α -Sekretaseaktivität werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.²¹³

Im Hinblick auf die Funktionen von ADAM10 bei Entzündungsreaktionen oder Krebserkrankungen wäre eine Inhibition der proteolytischen Aktivität von Interesse. So könnten, basierend auf den beschriebenen Zusammenhängen in Kapitel 1.5.3, die Tumorphiliferation und Migration gehemmt werden. Ebenso erscheint es möglich, chronische Entzündungsreaktionen durch Applikation eines ADAM10-Inhibitors positiv zu beeinflussen. Um allerdings einen nachteiligen Effekt auf die essentiellen Funktionen von ADAM10 im Gehirn, wie z. B. der Prozessierung von APP, zu vermeiden, müsste der Einsatzort lokal beschränkt sein. Eine mögliche Begrenzung könnte dabei die natürliche Blut-Hirn-Schranke darstellen, die der entsprechende ADAM10-Inhibitor nicht passieren dürfte. Zusätzlich sollten die Inhibitoren möglichst selektiv sein, da ansonsten andere inhibierte Proteine, insbesondere verwandte ADAMs oder MMPs, zu nicht überschaubaren Nebeneffekten führen könnten.^{177, 214}

Steigerung der α -Sekretase/ADAM10-Aktivität

Bezüglich der Steigerung der Prozessierung von APP durch die α -Sekretase gibt es verschiedene Forschungsansätze. Prinzipiell könnten schon die frühen Stadien der Gentranskription moduliert werden, genauso wie die Translation, der intrazelluläre Transport und die Enzymreifung zum aktiven Protein. Aber auch die indirekte Aktivierung des membrangebundenen ADAM10 durch die Beeinflussung von interagierenden Proteinen, Zelloberflächenrezeptoren oder Membraneigenschaften ist möglich.²¹³

Die Modulation der Gentranskription, welche die exprimierte ADAM10-Menge erhöht, ist aufgrund der Notwendigkeit einer spezifischen Regulation einzelner Gene schwierig, dennoch ist dieses in einigen Fällen gelungen. So wurde entdeckt, dass Retinsäure, eine bioaktive Form des Vitamin A, ADAM10 reguliert. Durch Zugabe des Vitamin A-Derivats Acitretin **83**, welches als Medikament zur Behandlung von Schuppenflechte zugelassen ist, konnte eine erhöhte Gentranskription gemessen werden (Abbildung 42). Mechanistisch wird der Effekt mit der Freisetzung von *all-trans*-Retinsäure, nach Interaktion von Acitretin **83** mit einem Retinsäurebindenden Protein, erklärt. Durch die erhöhte Retinsäurekonzentration werden Retinsäurerezeptoren und ADAM10-Expression aktiviert. Zusätzlich konnte im transgenen Mausmodell (APP/PS1-21) nach intrazerebraler Injektion des Wirkstoffes **83** eine Reduktion von A β ₄₀ und A β ₄₂ beobachtet werden.^{215, 216}

Gestützt von der Identifizierung einer endoplasmatischen Retikulum-Retentions-Sequenz im intrazellulären Teil von ADAM10, könnte der intrazelluläre Transport zur Zellmembran beeinflusst werden. Ein Austausch des zweiten Arginins der Arginin-reichen Sequenz durch Alanin führte zu einem erhöhten ADAM10-Anteil in der Zellmembran, sowohl in heterologen Zellen als auch in Neuronen des Hippocampus. Allerdings konnten die Mechanismen und Interaktionspartner, die den Austritt aus dem endoplasmatischen Retikulum regulieren, nicht aufgeklärt werden, so dass dies bezüglich noch weitere Untersuchungen notwendig sind.²¹⁷

Experimente mit dem in der Behandlung von AD-Patienten eingesetzten AChE-Hemmer Donepezil **2** konnten neue Wirkmechanismen des Inhibitors offenbaren (Kapitel 1.1.2). Nach Inkubation von humanen Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) mit Donepezil **2** konnte nach zwei Stunden eine erheblich reduzierte AChE-Aktivität und zusätzlich eine signifikant erhöhte Konzentration an APPs α im Medium bei konstanter Gesamt-APP-Menge ermittelt werden. Darüber hinaus zeigten die behandelten Zellen ein gesteigertes ADAM10-Level in der Zellmembran, so dass auf eine Wirkung des Medikaments **2** auf den Transport und/oder die Reifung von ADAM10 geschlossen wurde.²¹⁸

Die Proteinkinase C (PKC) aktiviert die α -Sekretase und senkt die Bildung von A β -Peptiden. Die PKCs können von sekundären Botenstoffen wie Calciumionen oder Diacylglycerinen (DAGs) reguliert werden. Eine an die DAG-Bindungsstelle bindende Substanz ist das natürlich vorkommende, marine, makrozyklische Polyketid Byrostatin-1 **84** (Abbildung 42). Dieses inhibiert Tumorwachstum und ist ein vielversprechender Kandidat zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten. Im AD-Mausmodell konnte die Applikation von Byrostatin-1 **84** die Menge an APPs α erhöhen, während gleichzeitig die Bildung von A β reduziert wurde. Zusätzlich konnte in Ratten eine Verbesserung der mit AD verbundenen

Verhaltensauffälligkeiten beobachtet werden. Die Wirkung von Byrostatin-1 **84** in AD-Mäusen wurde mit PKC, insbesondere mit PKC ϵ , in Verbindung gebracht.^{213, 219-221}

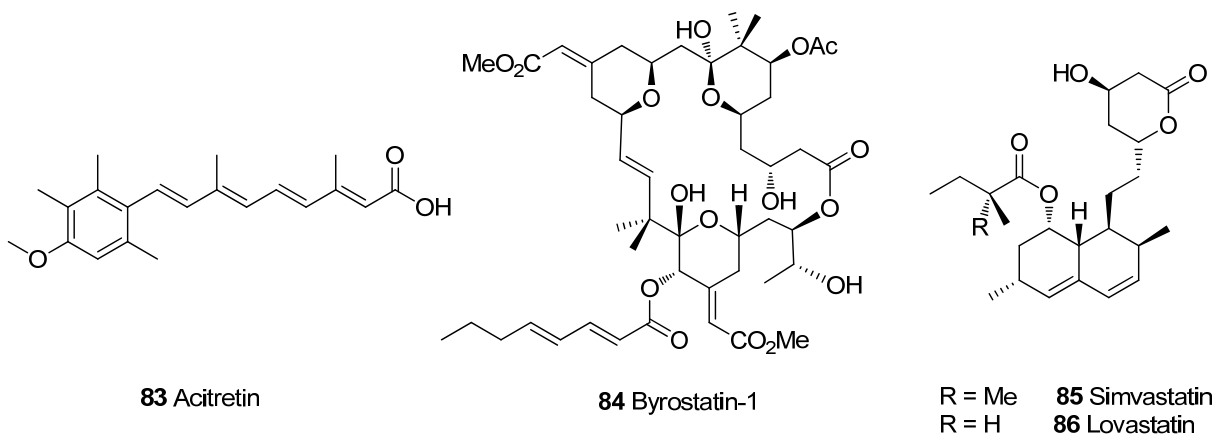


Abbildung 42: Strukturformeln von Substanzen, die eine erhöhte α -Sekretase/ADAM10-Aktivität auslösen.²²²⁻²²⁴

Die Verbindung von Cholesterin mit der Produktion von A β und Alzheimer-Erkrankungen wurde weitumfassend untersucht und zahlreich untermauert. Aus voneinander unabhängigen retrospektiven Studien wurde eine reduzierte Inzidenz von AD und anderen Demenzen bei Patienten, die mit Cholesterin-senkenden Medikamenten, sogenannten Statinen, behandelt wurden, berichtet.^{225, 226} Anhand von zwei Statinen, Simvastatin **85** und Lovastatin **86**, konnte *in vitro* gezeigt werden, dass diese zugelassenen Medikamente die Konzentration an intrazellulären und extrazellulären A β_{40} und A β_{42} in Neuronen des Hippocampus senken (Abbildung 42). Für Simvastatin **85** wurde diese Beobachtung auch *in vivo* bestätigt.²²⁷

Separat gelang die Identifizierung von ADAM10 als das Enzym, welches von den Statinen beeinflusst wird. Die Behandlung von verschiedenen peripheren und neuronalen Zelllinien mit Lovastatin **86** oder Methyl- β -cyclodextrin **87**, einer Cholesterin-extrahierenden Substanz, führte zu einer stark erhöhten Konzentration an APPs α , dem durch die α -Sekretase/ADAM10 freigesetzten APP-Fragment.²²⁸ Allerdings sind prospektiven Untersuchungen zu der Wirksamkeit von Statinen auf AD nicht eindeutig, so wurden auch gegenteilige Ergebnisse erhalten, die keinen Effekt auf die Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen offenbaren.^{229, 230}

Bis zur tatsächlichen Anwendung dieser Konzepte und Wirkstoffe an AD-erkrankten Patienten sind noch zahlreiche Untersuchungen und klinische Studien notwendig, zumal die Aktivierung der α -Sekretase/ADAM10 im Hinblick auf die Vielzahl an Substrate und damit verbundenen Nebenwirkungen umstritten bleibt.^{179, 213}

ADAM10 Inhibitoren

Bei den ADAM10-Inhibitoren können zwei Klassen unterschieden werden: Zum einen gibt es die endogenen Inhibitoren, die eine regulatorische Aktivität auf ADAM10 haben, und zum anderen die synthetischen Inhibitoren.

Zu den endogenen Inhibitoren gehören die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), von denen TIMP-1 und TIMP-3 ADAM10 inhibieren. Die TIMPs liegen extrazellulär abgesondert vor und können mit verschiedenen membrangebundenen Proteinen an der Zelloberfläche assoziiert sein. Verschiedene Untersuchungen deuten auf einen Mechanismus hin, der nicht auf der Inhibition von MMPs durch TIMPs basiert. Es wird angenommen, dass, zumindest bei ADAM10, mehrere voneinander entfernte Interaktionsstellen involviert sind.^{175, 231-233}

Ein weiteres ADAM10-regulierendes Protein ist *reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs* (RECK), das im Zusammenhang mit der Regulation des Notch-Signalwegs steht und membrangebunden vorliegt.²³⁴

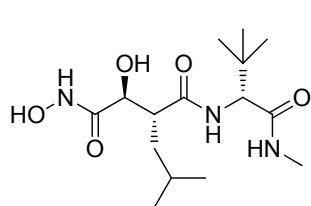
Zusätzlich können auch, wie bereits zuvor beschrieben, die freigesetzten Prodomänen von ADAM10 die reife Enzymform selektiv inhibieren.¹⁸⁸

Die meisten synthetischen ADAM10-Inhibitoren weisen einen peptidähnlichen Aufbau auf und enthalten eine Hydroxamsäurefunktion, die an das katalytisch aktive Zinkatom koordinieren kann.²³⁵ Ein häufig als ADAM-Inhibitor beschriebener Wirkstoff ist Marimastat **88**, welcher aber neun MMPs potenter inhibiert als ADAM10 ($IC_{50}(\text{ADAM10}) = 78 \text{ nM}$) und ADAM17 ($IC_{50}(\text{ADAM17}) = 12 \text{ nM}$).²³⁶ Zahlreiche klinische Studien mit dem anfangs vielversprechenden Anti-Krebswirkstoff **88** mussten aufgrund von verminderter Wirksamkeit *in vivo* und fehlender Selektivität gegenüber einzelner Metalloproteasen eingestellt werden.²³⁷

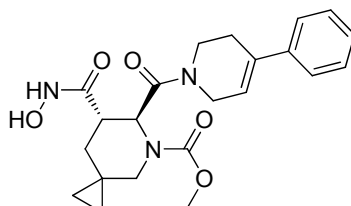
Ein oral bioverfügbarer Inhibitor, der eine gute Aktivität gegenüber ADAM10 ($IC_{50}(\text{ADAM10}) = 22 \text{ nM}$) und ADAM17 ($IC_{50}(\text{ADAM17}) = 14 \text{ nM}$) zeigt, ist INCB3619 **89** (Abbildung 43).²³⁶ Allerdings werden auch einige MMPs ähnlich potent inhibiert, weshalb der Inhibitor **89** für die klinische Anwendung nicht selektiv genug ist. Es konnte demonstriert werden, dass INCB3619 **89** die Spaltung von ErbB-Liganden hemmt. Dadurch wird *in vivo* in tumortragenden Mäusen der ErbB-Signalweg, die Tumorzellproliferation und das Tumorzellüberleben reduziert.²³⁸ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass INCB3619 **89** das Tumorstadium in einigen vorklinischen Modellen inhibiert. Auch synergetische Effekte mit anderen Krebsmedikamenten wurden beobachtet.^{236, 239}

Ein strukturell verwandter Inhibitor, INCB8765 **90**, weist eine 21-fach erhöhte Aktivität gegenüber ADAM10 ($IC_{50}(\text{ADAM10}) = 97 \text{ nM}$) im Vergleich zu ADAM17

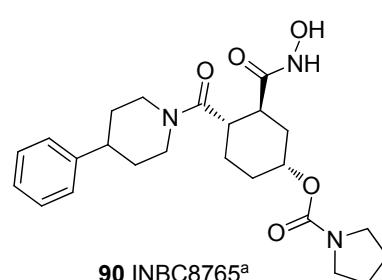
($IC_{50}(\text{ADAM17}) = 2045 \text{ nM}$) auf.¹²⁸ Dieser wurde aber im Vergleich zu INCB3619 **89** nur in zwei Studien und damit deutlich seltener als ADAM-Inhibitor eingesetzt.^{236, 240}



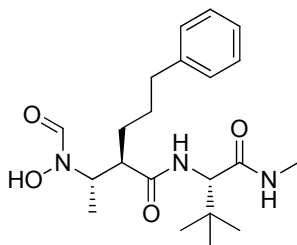
88 Marimastat
 $IC_{50}(\text{ADAM10}) = 78 \text{ nM}$
 $IC_{50}(\text{ADAM17}) = 12 \text{ nM}$



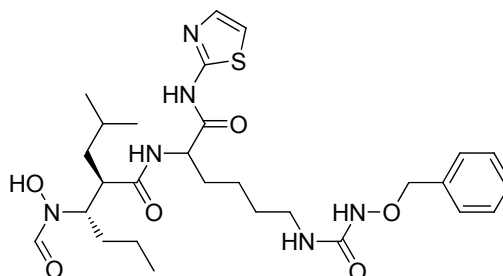
89 INCB3619
 $IC_{50}(\text{ADAM10}) = 22 \text{ nM}$
 $IC_{50}(\text{ADAM17}) = 14 \text{ nM}$



90 INBC8765^a
 $IC_{50}(\text{ADAM10}) = 97 \text{ nM}$
 $IC_{50}(\text{ADAM17}) = 2045 \text{ nM}$



91 GI254023X
 $IC_{50}(\text{ADAM10}) = 5,3 \text{ nM}$
 $IC_{50}(\text{ADAM17}) = 541 \text{ nM}$



92 GW280264X
 $IC_{50}(\text{ADAM10}) = 11,5 \text{ nM}$
 $IC_{50}(\text{ADAM17}) = 8,0 \text{ nM}$

Abbildung 43: Strukturformeln der vorgestellten ADAM10-Inhibitoren. ^a Die Strukturformel von INBC8765 **90** wurde aus dem IUPAC-Namen erstellt.^{236, 238, 241}

Aus einer Reihe von Hydroxamsäure-Inhibitoren konnte Ludwig *et al.* GI254023X **91** identifizieren, das ADAM10 ($IC_{50}(\text{ADAM10})=5,3 \text{ nM}$) mehr als 100-fach besser inhibiert als ADAM17 ($IC_{50}(\text{ADAM17})=541,0 \text{ nM}$).²⁴¹ Neben ADAM10 und ADAM17 wurden keine weiteren ADAMs beeinflusst. Allerdings werden MMP-9 und -13 im niedrigen mikromolaren Bereich gehemmt, was aber keinen Einfluss auf die untersuchten Spaltvorgänge von ADAM10 und ADAM17 hatte. Es konnte im zellbasierten Assay gezeigt werden, dass der ADAM10-Inhibitor **91** die Abspaltung von IL-6R, CX3CL1 und CXCL16, von denen bereits ein Zusammenhang mit ADAM10, aber nicht mit ADAM17 berichtet wurde, hemmt. Die PMA-induzierte Spaltung durch ADAM17 wurde von GI254023X **91** nicht beeinträchtigt. Als Kontrolle wurde der Inhibitor GW280264X **92**, der ADAM17 ($IC_{50}(\text{ADAM17})=8,0 \text{ nM}$) und ADAM10 ($IC_{50}(\text{ADAM10})=11,5 \text{ nM}$) nahezu gleichermaßen inhibiert, eingesetzt. Dieser hat

neben den ADAM10-assoziierten Vorgängen auch die PMA-induzierte Spaltung durch ADAM17 gehemmt.^{235, 241, 242} Experimente mit Neuroblastomzellen konnten die ADAM10-inhibierende Wirkung von GI254023X **91** bestätigen, in dem die Konzentration an APPsα gemessen wurde. Durch Hemmung der α-Sekretase/ADAM10 wurde eine Reduktion der Konzentration auf 30% beobachtet (Abbildung 43).²⁴³

GI254023X **91** ist nach heutigem Stand der selektivste und meist verwendete ADAM10-Inhibitor, der für zahlreiche Untersuchungen von physiologischen Prozessen, in die ADAM10 involviert ist, eingesetzt wird.²⁴⁴⁻²⁴⁶

Die Synthese von GI254023X **91** wurde im Jahre 2000 von dem Pharmaunternehmen GlaxoSmithKline patentiert und konnte in der Arbeitsgruppe Schmidt im Hinblick auf die Ausbeute, Durchführbarkeit und Detektion der Zwischenstufen verbessert werden. Eine Zusammenfassung der optimierten Synthese ist in Abbildung 44 dargestellt.^{235, 247}

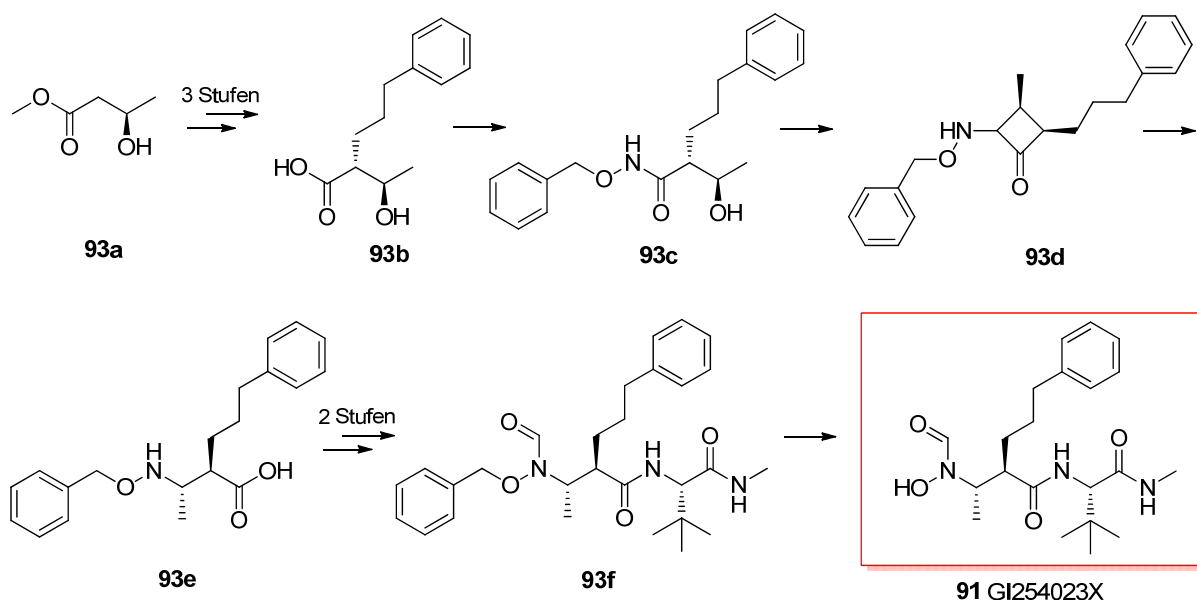


Abbildung 44: Verbesserte Synthese des ADAM10-Inhibitors GI254023X **91**.²³⁵

Die Entwicklung von selektiven ADAM10-Inhibitoren ist nicht nur für die klinische Anwendung als Anti-Krebsmedikament wichtig, sondern auch für die weitere Erforschung der zahlreichen physiologischen und pathologischen Vorgänge, in die ADAM10 involviert ist. Denn erst mit dem Wissen über die assoziierten Proteine und Prozesse können selektive und potente Wirkstoffe sowie Strategien zur Behandlung von Erkrankungen erstellt werden.¹⁷⁷

2. Zielsetzung

Selten vergeht eine Woche ohne neue Zeitungsartikel, Dokumentationen oder Talkshows zum Thema Demenzen, im Besonderen Alzheimer-Demenz. Grund hierfür ist der demographische Wandel und die damit implizierte Alterung der Gesellschaft in vielen Industrieländern. Durch das Andauern dieser Entwicklung wird die Anzahl der AD-Erkrankungen weiterhin zunehmen, und damit die Notwendigkeit potenter Interventionen. Die Behandlungsmöglichkeiten von AD-Patienten sind bis heute limitiert. So kann lediglich der Krankheitsverlauf verlangsamt werden. Am Schluss endet AD trotz aller Bemühungen aber immer tödlich.

γ -Sekretase-Modulatoren

Eine weit erforschte Strategie zur Behandlung von AD ist die Inhibition der γ -Sekretase. Die Protease setzt A β -Fragmente frei, die zu pathogenen amyloiden Plaques, einem Hauptmerkmal von AD, aggregieren können. Bedingt durch Nebenwirkungen der vollständigen Inhibition des Enzyms hat sich die Forschung auf die Entwicklung von γ -Sekretase-Modulatoren verlagert. Die Synthese und Evaluation neuer GSMs ist ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Allerdings sind Struktur-basierte Ansätze zur gezielten Entwicklung potenter GSMs derzeit nicht möglich, da die Proteinstruktur der γ -Sekretase und der detaillierte Mechanismus der Modulation noch unbekannt sind. Daher sollten zusätzlich auch Untersuchungen zur Lokalisation von GSMs in der Membran unternommen werden.

DYRK1A

Ein weiteres Teilgebiet dieser Arbeit stellt die Inhibition von DYRK1A dar. Die Kinase konnte sowohl mit der Amyloidhypothese als auch mit der Tau-Hypothese, die beide Erklärungsansätze zur Entstehung von AD liefern, in Zusammenhang gebracht werden. Damit ist es ein vielversprechendes Target zur Entwicklung von potenten und selektiven Wirkstoffen zur Behandlung von AD-Patienten. Da der zurzeit potenteste und oral bioverfügbare DYRK1A-Inhibitor, Harmin **25**, ein β -Carbolin und damit ein Carbazol-Analogon ist, sollten hier die Kenntnisse zu den Derivatisierungen der Carbazole als GSMs auf dieses Target übertragen werden. Auf Basis der Leitstruktur Harmin **25** sollte im Rahmen dieser Arbeit die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von β -Carbolinderivaten als DYRK1A-Inhibitoren untersucht werden. Mit Hilfe computerbasierter Methoden, wie der Erstellung eines Pharmakophormodells und molekularem Docking, sollten Derivatisierungsmöglichkeiten offenbart werden. Ziel war es durch die anschließende Synthese und biologische Evaluation das computergestützt entwickelte Modell zu verifizieren. Zusätzlich sollte der größte Nachteil

von Harmin **25**, die Koinhibition von MAO-A, welche zu nicht tragbaren Nebeneffekten führt, vermindert werden. Deshalb war die Anforderung, dass die neuen aktiven DYRK1A-Inhibitoren eine gegenüber Harmin **25** verbesserte Selektivität aufweisen und MAO-A nicht inhibieren.

ADAM10 und GI254023X **91**

Eine andere viel diskutierte Methode ist die Aktivierung der α -Sekretase (ADAM10). Jedoch werden immer mehr Substrate dieser Protease und damit verbundene Funktionen entdeckt, wodurch mögliche Nebeneffekt auf andere physiologische Mechanismen durch Applikation eines aktivierenden Agens nicht vollständig absehbar sind. Mittels Identifizierung eines potenten, selektiven ADAM10-Inhibitors, GI254023X **91**, können metabolische Vorgänge untersucht werden. Daneben ist die Inhibition von ADAM10 ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen.

Basierend auf der im Arbeitskreis von Prof. Schmidt verbesserten Synthese des Inhibitors **91** ist dessen Darstellung und Aufreinigung ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Hierdurch sollten Untersuchungen ermöglicht werden, die Erkenntnisse über die physiologischen und pathologischen Zusammenhänge mit der ADAM10-Aktivität liefern.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Entwicklung und Evaluation neuer γ -Sekretase-Modulatoren

Aufgrund der komplexen Struktur der γ -Sekretase konnte diese bis heute nicht vollständig isoliert werden. Ebenso wenig gelang die Kristallisation der Protease, die eine Analyse der Proteinstruktur ermöglichen würde. Ohne diese Informationen muss das Design neuer potentieller GSMs auf Basis von bekannten GSMs und evaluierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erfolgen. In den folgenden Kapiteln soll die Entwicklung neuer GSMs und die daraus ermittelten Ergebnisse und Hypothesen vorgestellt werden.

3.1.1. Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Carbonsäurefunktion

Einleitung und Motivation

Im Arbeitskreis von Prof. Schmidt konnten bislang zahlreiche NSAID-abgeleitete GSMs auf Basis des Carprofen **20**- oder Carbazol **23**-Grundgerüsts synthetisiert werden (Kapitel 1.2.3).^{79, 81, 82}

Photoaffinitätsuntersuchungen mit einem Biotin-markiertem *R*-Flurbiprofenderivat **93** deuten auf eine Bindestelle der NSAID-abgeleiteten GSMs nahe der GxxxG-Region von APP hin. Dieses Motiv steht in Zusammenhang mit der transmembranen Dimerisation von APP. Hierdurch könnte die Interaktion eines Modulators an dieser Bindungsstelle die Dimerisation beeinflussen und damit zu einer geänderten γ -Sekretaseaktivität führen.²⁴⁸⁻²⁵¹

Ein Vergleich potenter Modulatoren führte zu einer Hypothese des Bindungsmodus der Substanzen, nach der postuliert wird, dass die freie Carbonsäurefunktion, welche ein gemeinsames Strukturmerkmal vieler NSAID-abgeleiteter GSMs ist, an eine basische Aminosäure bindet. Hierfür wurde Lysin 624 vorgeschlagen, das in der Nähe des GxxxG-Motivs von APP lokalisiert ist. Diese Interaktion der Modulatoren mit APP nahe der Membranoberfläche scheint für die eigentliche modulatorische Funktion verantwortlich zu sein, während der lipophile Rest als „Membrananker“ die Substanz innerhalb der Membran stabilisieren könnte (Abbildung 45).⁸²

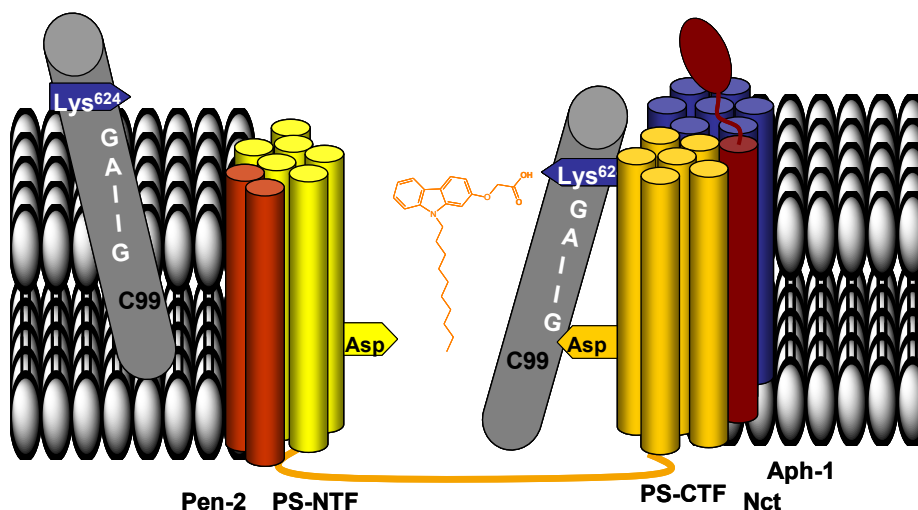


Abbildung 45: Hypothese des Bindungsmodus von NSAID-abgeleiteten GSMs an APP innerhalb der γ -Sekretase. Kopie aus Baumann *et al.*, BMCL, Vol.19, S. 6986. Copyright 2009 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.⁸²

Die freie Carbonsäurefunktion ist ein gemeinsames Strukturmerkmal der meisten NSAID-abgeleiteten GSMs, welches allerdings das klinische Potential dieser Derivate vermindert. Eine derartig polare Funktion an einem potentiellen Wirkstoff beeinflusst die Permeation der Blut-Hirn-Schranke. Nur eine ausreichende Konzentration des Modulators im Gehirn von Patienten kann die erwartete Wirkung hervorrufen. Motiviert durch diese Problematik sollten im Rahmen dieser Arbeit Säureisosteren und mögliche Vorläuferfunktionen, als besser applizierbare Ersatzfunktionen, auf ihre γ -Sekretaseaktivität untersucht werden. Als Leitstruktur diene hierbei der bekannte GSM BSc3030 **94** auf Basis des Carbazolgrundgerüsts.⁷⁹ Ein Austausch der Säurefunktion zu einem Amid im Carbazolderivat BSc4531 **95** sollte eins von insgesamt 33 in Vorarbeiten untersuchten Derivaten darstellen (Abbildung 46).

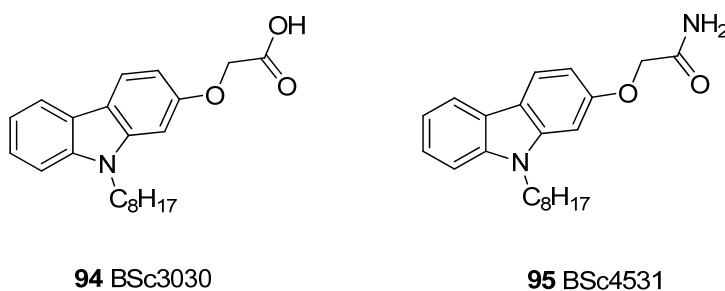


Abbildung 46: Strukturformeln der Leitstruktur (BSc3030) **94** und des geplanten Amidcarbazolderivats (BSc4531) **95**.⁷⁹

Die Publikation von Zall *et al.* in 2011 ist als Unterkapitel mit entsprechender Zusammenfassung angehängt.²⁵¹

Synthese des Amidcarbazols 95

Die Syntheseplanung des Amidcarbazols **95** sieht eine Synthese analog der Darstellung der Leitstruktur **94** vor. Hierfür soll das Amidcarbazol **95** aus dem Octylsubstituierten Hydroxycarbazol **96** generiert werden, welches wiederum durch *N*-Substitution aus dem kommerziell erhältlichen 2-Hydroxycarbazol **97** dargestellt werden kann.

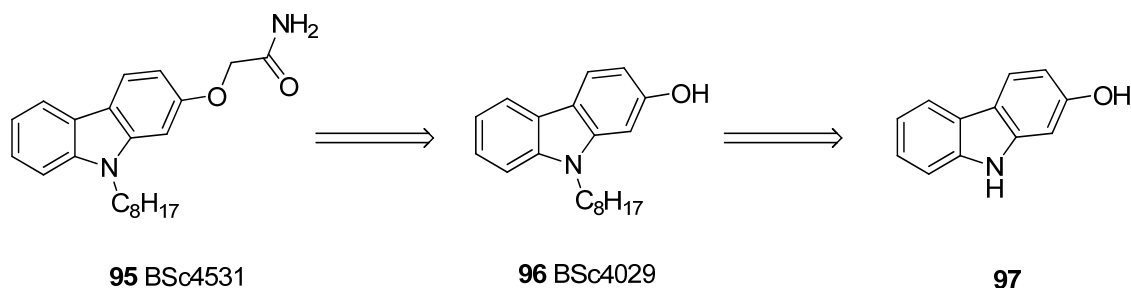


Abbildung 47: Retrosynthetischer Ansatz für die Synthese des Amidcarbazols **95** (BSc4531).

Das 2-Hydroxycarbazol **97** wurde mit zwei Äquivalenten Natriumhydrid als Base voraktiviert. Dabei wird sowohl das Phenol als auch das Amin deprotoniert, so dass ein Dianion vorliegt. Zugabe von Octylbromid in leichtem Überschuss führte hauptsächlich zur Substitution des Bromids mit dem deprotonierten, nucleophilen Amin, allerdings wurde auch im geringen Maße das Phenolat verethert. Zusätzlich zu den beiden möglichen monoalkylierten Derivaten wurde auch ein minimaler Anteil dialkylierten Nebenprodukt gebildet. Die Abtrennung der Nebenprodukte konnte durch säulenchromatographische Reinigung erzielt werden, wobei das Zwischenprodukt **96** in einer Ausbeute von 69 % vorlag. In der zweiten Synthesestufe wurde das alkylierte Hydroxycarbazol **96** mit Kaliumcarbonat als Base suspendiert und anschließend mit 2-Bromacetamid umgesetzt. Das Amidcarbazolderivat **95** wurde nach Reinigung in 87 %iger Ausbeute und mit einer Reinheit von 99 % erhalten (Abbildung 48).

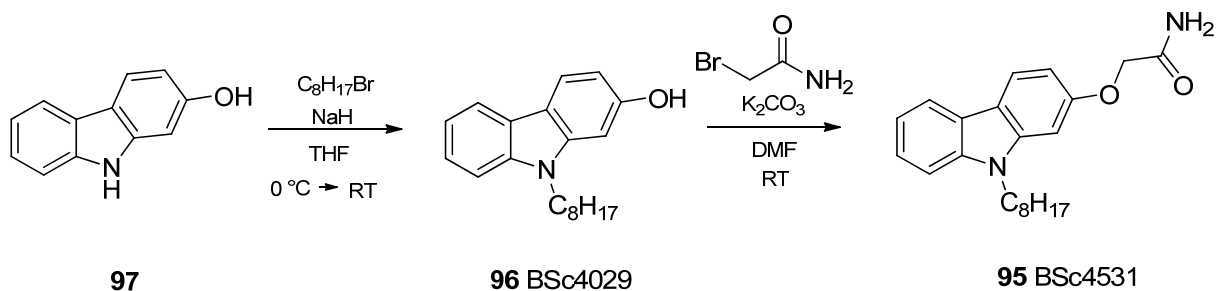
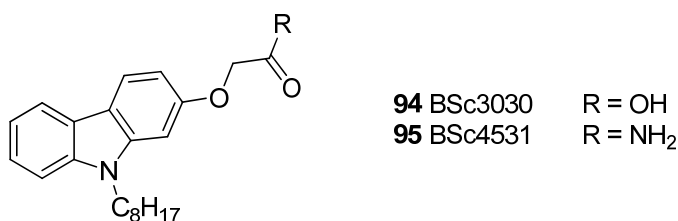


Abbildung 48: Synthese des Amidcarbazolderivats **95** (BSc4531).

Biologische Aktivität des Amidcarbazolderivats 95

Die Aktivität des synthetisierten Amidcarbazolderivats **95** gegenüber der γ -Sekretase wurde in einem zellulären Assay bei der Firma Hoffmann-La Roche bestimmt. Das Assay wird in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Bedingt durch die vertraglichen Kooperationsbedingungen darf hier nur der Inhibitionswert für die Isoform A β ₄₂ gezeigt werden.^{81, 82, 251, 252}

Tabelle 3: Aktivitäten der Leitstruktur **94** und des Amidcarbazolderivats **95**.^{79, 251}



Substanz	BSc-Nummer	IC ₅₀ (A β ₄₂) [μ M]	Zelltoxizität [μ M] ^a	Anmerkung
94	3030	19	-	Modulator
95	4531	104	160	Inhibitor

^a Konzentration mit signifikanter Zelltoxizität.

Das synthetisierte Amidcarbazolderivat **95** inhibiert die γ -Sekretase mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 104 μ M, welches wesentlich schwächer ist als die Aktivität der entsprechenden Leitstruktur (IC₅₀(A β ₄₂) = 19 μ M). Zusätzlich zeigt **95** nicht die bevorzugte modulatorische Wirkung, sondern inhibiert die γ -Sekretase lediglich. Somit führt der Austausch der Carbonsäurefunktion durch ein Amid zu keiner Verbesserung der Aktivität gegenüber der γ -Sekretase. Die Notwendigkeit der Carbonsäurefunktion oder eines metabolisch labilen Vorläufers konnte auch anhand weiterer Derivate herausgestellt werden und wurde in Zusammenarbeit mit Kollegen von Zall *et al.* in 2011 publiziert. Die Publikation und eine Zusammenfassung sind im folgenden Abschnitt angefügt.

Publikation: Die NSAID-abgeleitete γ -Sekretase-Modulation erfordert eine Säurefunktion am Carbazolgrundgerüst

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:²⁵¹

Autoren: Andrea Zall, Daniel Kieser, Nicole Höttecke, Eva C. Naumann, Binia Thomaszewski, Katrin Schneider, Dirk T. Steinbacher, Robert Schubanel, Stefan Masur, Karlheinz Baumann, Boris Schmidt.

Titel: „NSAID-derived γ -secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold“.

Journal: Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2011**, 19, 5, 4903-4909

DOI: 10.1016/j.bmc.2011.06.062.

Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [Copyright © 2011].

Zusammenfassung:

Eine vielversprechende Strategie zur Behandlung von AD ist die Modulation der γ -Sekretase. Viele NSAID-abgeleitete γ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) weisen eine Carbonsäurefunktion als gemeinsames Strukturmerkmal auf, welche für die eigentliche modulatorische Funktion verantwortlich scheint. Experimente mit Photoaffinitäts-markiertem *R*-Flurbiprofen **93** deuten auf eine Wechselwirkung der NSAID-abgeleiteten GSMs mit dem Substrat APP in der Nähe des GxxxG-Motivs hin. Diese könnte durch die Interaktion einer basischen Aminosäure, wie Lysin 624, mit der Carbonsäure des GSM hervorgerufen werden.

Häufig ist allerdings die klinische Anwendbarkeit bei potentiellen Medikamenten mit freier Carbonsäurefunktion eingeschränkt, da die Permeation der Blut-Hirn-Schranke durch die sehr polare funktionelle Gruppe beeinträchtigt wird. Daher wurde in dieser Veröffentlichung die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von 33 Carbazolderivaten mit verschiedenen Säureisosteren und metabolischen Vorläufern untersucht. Die in einem zellulären Amyloid-Sekretions-Assay bestimmten Aktivitäten gegenüber der γ -Sekretase bestätigen die Notwendigkeit einer Carbonsäurefunktion oder einer metabolisch labilen Esterfunktion in potenten NSAID-abgeleiteten GSMs.

Beitrag zur Arbeit: Synthese von **BSc4531 95** (entspricht in der Publikation Compd. **36**). Überarbeitung des Manuskriptes hinsichtlich der Korrektur der von den Referees geforderten Änderungen.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

NSAID-derived γ -secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold

Andrea Zall^a, Daniel Kieser^a, Nicole Höttecke^a, Eva C. Naumann^a, Binia Thomaszewski^a, Katrin Schneider^a, Dirk T. Steinbacher^a, Robert Schubel^b, Stefan Masur^b, Karlheinz Baumann^b, Boris Schmidt^{a,*}

^a Clemens Schöpf-Institute of Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstr. 22, Darmstadt D-64287, Germany

^b F. Hoffmann–La Roche Ltd, Pharmaceuticals Division, Preclinical Research CNS, Bldg. 70/345, Basel CH 4070, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Revised 21 June 2011

Accepted 22 June 2011

Available online 29 June 2011

Keywords:

Alzheimer's disease
 γ -Secretase modulation
Carboxylic acid isosteres
Carprofen

ABSTRACT

Modulation of γ -secretase activity holds potential for the treatment of Alzheimer's disease. Most NSAID-derived γ -secretase modulators feature a carboxylic acid, which may impair blood–brain barrier permeation. The structure activity relationship of 33 carbazoles featuring diverse carboxylic acid isosteres or metabolic precursors thereof was established in a cellular amyloid secretion assay. The modulatory activity was observed for acidic moieties and metabolically labile esters only, which supports our hypothesis of an acid–lysine interaction to be relevant for this type of γ -secretase modulators.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease, it is a devastating illness effecting more than 20 million patients globally. The brain atrophy associated with AD is accompanied by the hallmark amyloid plaques and fibrillary tangles. The plaques consist of aggregated oligomeric amyloid- β -peptides ($A\beta$) of various lengths wherein $A\beta_{42}$ is more prone to aggregate than $A\beta_{40}$ or $A\beta_{38}$.¹ These $A\beta$ -peptides are generated by sequential processing of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase. The γ -secretase complex catalyzes the critical step in the liberation of these $A\beta$ isoforms, and is thus a promising target in the prevention of AD. The membrane located γ -secretase-complex consists of four proteins: nicastrin (Nct), anterior-pharynx defective-1 (Aph-1), presenilin enhancer (Pen-2) and presenilin (PS1 or PS2).² PS1 is a nine transmembrane domain (TMD) protein which bears two catalytic aspartates Asp²⁵⁷ and Asp³⁸⁵ in the transmembrane domains 6 and 7.^{3–5} These catalytic domains cleave APP within the membrane, implicating an unusual regulated intramembrane proteolysis (RIP) in the lipophilic membrane.^{6–8}

Several inhibitors for this process have been reported recently.⁷ However, most of these inhibit the cleavage of other γ -secretase substrates such as Notch, which is responsible for cell proliferation. Some NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) show a partial inhibition, the so called modulation of the γ -secretase cleavage,

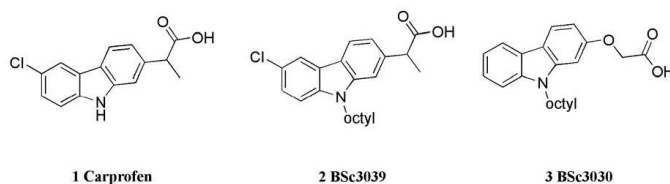
which is characterized by increased $A\beta_{38}$ secretion and decreased $A\beta_{42}$ secretion.⁹ Photoaffinity labeling experiments with an *R*-flurbiprofen derivative suggest a binding site for NSAID-derived γ -secretase modulators directly on the substrate APP close to the GxxxG region,^{10,11} which is responsible for substrate dimerization and may control the processing by γ -secretase.¹⁸ We suggested an interaction of the NSAID's carboxylic acid with a basic amino acid, for example, lysine⁶²⁴ on APP, which is located in the vicinity of the GxxxG motif, at the membrane interface.¹² We reported on lipophilic *N*-alkylated carprofen-derivatives and *N*-sulfonylated or *N*-alkylated carbazolyloxyacetic acids which are structurally related to the substrate targeting γ -secretase modulator flurbiprofen (sGSMs).^{13,14} The *N*-alkyl chain strongly enhances the modulator activity; this may be partially due to modulator orientation via a membrane anchoring effect (Scheme 1). The structural differences between acidic NSAID derived GSMs and the basic GSMs¹⁷ stimulated us to explore the structure activity relationship of the carboxylic acid. This acid may interact with the substrate and thereby influence the positioning of the substrate in relation to PS1, which has been shown to be crucial for the cleavage event.¹⁹

2. Methods and results

Herein we report the replacement of the carboxylic acid on carprofen-derived GSMs **2** ($IC_{50}(A\beta_{38})$ = not determined at max concn 100 μ M, $IC_{50}(A\beta_{40})$ >40 μ M, $IC_{50}(A\beta_{42})$ = 6.9 μ M) and **3** ($EC_{50}(A\beta_{38})$ = 24 μ M, $IC_{50}(A\beta_{40})$ >40 μ M, $IC_{50}(A\beta_{42})$ = 19 μ M) by carboxylic acid isosteres and carboxylic acid derivatives. This

* Corresponding author.

E-mail address: schmidt_boris@mac.com (B. Schmidt).



Scheme 1. Carprofen (1)⁹ is the GSM-lead structure of 2 and 3.¹⁴

replacement aimed to reduce the topological polar surface area and the amphiphilicity of the lipophilic acids. This was expected to effect the blood–brain barrier (BBB) permeation.^{13,14} Carboxylic acid isosteres require related environments as the carboxylic acid for target binding and thus some of them were expected to display γ -secretase modulatory effects. We chose several established carboxylic acid isosteres such as tetrazole, sulfonic acid, amides, sulfone amides and tetronates. We included alcohols, nitriles and amines as controls to obtain either straight or inverse γ -secretase modulators. In addition, we explored the modulator binding site by the introduction of sterically demanding groups. The synthesis was carried out according to Scheme 2 (explicit synthesis: see Section 3 and Supplementary data). The amphiphilicity of these alkylated acids may result in micelle formation at higher concentration, therefore the dose response evaluation was limited to a max concn of 100 μ M. This max concn excluded the IC_{50}/EC_{50} determination of less active compounds. However, the shape of the dose response (see Supplementary data for examples) allowed us to classify the compounds as reported in 2006.¹⁴ We observed four different modes of actions in our cellular assay: γ -secretase modulation (increase of $A\beta_{38}$, decrease of $A\beta_{42}$), inverse γ -secretase modulation (decrease of $A\beta_{38}$, increase of $A\beta_{42}$), γ -secretase inhibition (decrease of $A\beta_{38}$, decrease of $A\beta_{42}$) and lack of activity.

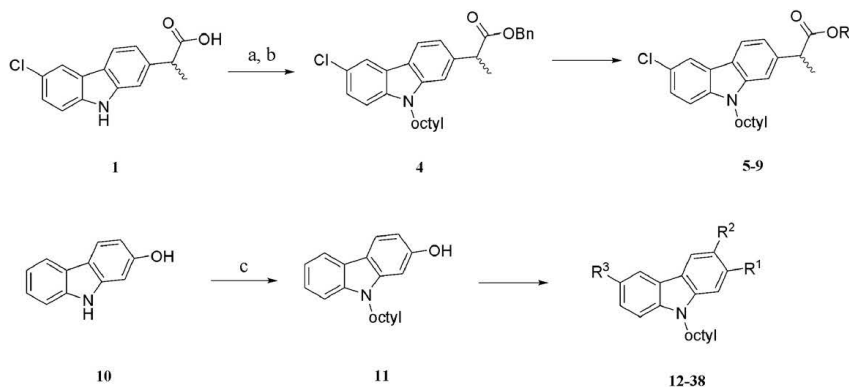
We kept the length of the supposed lipid anchor at eight carbon atoms, making a compromise between lipophilicity and activity, although this anchor does not provide the most active sGSM. The side chain of 3 (BSc3030) bears a methylene spacer, which is an important structural feature as an additional methylene diminished activity. This effect was observed for the carboxylic acid 17 and to a lesser extent for the sulfonic acid 18. Surprisingly, the dimethylation (29) diminished activity, although moderately potent γ -secretase activity modulating fenofibrate-derivatives have been reported.^{12,17} However, the replacement by a salicylic acid

(19, Table 1) displayed an $A\beta_{42}$ level reducing effect ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 38 \mu$ M). The salicylic acid locks the extended carbon chain in a Z-configuration resulting in close positioning of the carboxylic acid. Equipotent $A\beta_{42}$ level reducing activity compared to 19 was achieved by a tetronic acid (20) and a tetramic acid (21), which are rarely employed as carboxylic acid isosteres. Only a sterically more demanding tetramate (22) displayed a full inhibitory mode of action (Scheme 3).

On the contrary, the established isosteres: tetrazole (24) or the 2,2,2-trifluoroethanol (12) did not affect γ -secretase activity up to a concentration of 100 μ M or even caused increased $A\beta_{42}$ secretion. The linear alcohol 23 and bromide 13 were inactive. However, the α -branched alcohol 8 increases $A\beta_{42}$ secretion. The amines (25, 30–32) did not show modulatory activity. The nitrile (14) caused increased $A\beta_{42}$ secretion, whereas the amide (36) and the acidic sulfonimide (9) showed reduction of the $A\beta_{42}$ level. These results indicate the necessity of an acidic moiety on this scaffold to achieve modulatory activity. This supports our hypothesis that modulators interact with a basic amine on the substrate, because all GSMs of this series exhibit a pK_a value in the range of 2–5.


Additional substituents in the C-3 position of 3 revealed a tolerance for small functional groups like an aldehyde (33), but an additional propionic acid side chain (37) diminished activity (Scheme 4). These findings suggest a defined binding pocket for the modulators.




















The methyl ester 15 displayed unexpected $A\beta_{42}$ level reducing activity (Table 2, entry 4, $IC_{50}(A\beta_{42}) = 27 \mu$ M), a marginal loss in activity compared to the carboxylic acid 3 with an IC_{50} for $A\beta_{42}$ of 19 μ M. Further investigation confirmed the tolerance of short linear esters. However, the activity decreased with increasing length of the ester. The ethyl ester 34 showed $A\beta_{42}$ level reducing activity ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 31 \mu$ M), but *iso*-propyl (35) or *iso*-butyl ester (26) did not reduce $A\beta_{42}$ secretion. On the contrary, the tertiary



Scheme 2. Reagents: General synthesis of the carbazole derivatives. (a) Benzylbromide, K_2CO_3 , acetone, rt; (b) octylbromide, NaH, THF, 0 °C–rt; (c) octylbromide, NaH, THF, and 0 °C–rt.

Table 1
Activity of *N*-octylcarprofen and *N*-octylcarbazole derivatives



Entry	Compd	Mode of action	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /EC ₅₀ μM		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
1	5	iGSM		H	Cl	n.d. ^c	n.d. ^c	50 ^a
2	8	iGSM		H	Cl	n.d.	n.d. ^c	21 ^a
3	9	GSM		H	Cl	n.d.	n.d. ^c	32 ^a
4	11	GSI		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
5	12	iGSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	12 ^a
6	13	iGSM		H	H	>40	>40	>40
7	14	GSI		H	H	74	105	252 ^b
8	17	GSM		H	H	>80 ^a	>80	>80 ^b
9	18	GSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80 ^b
10	19	GSM		H	H	23 ^a	>80	38 ^b
11	20	GSM		H	H	21 ^a	>80	37 ^b
12	21	GSM		H	H	8 ^a	72	28 ^b
13	22	GSI		H	H	31	32	24
14	23	iGSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>40
15	24	GSI		H	H	165 ^b	102 ^b	113 ^b
16	25	iGSM		H	H	>80	>80	>80 ^a
17	29	GSM		H	H	>40 ^a	>40	>40
18	30	iGSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>10 ^a
19	31	GSM		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80

(continued on next page)

Table 1 (continued)

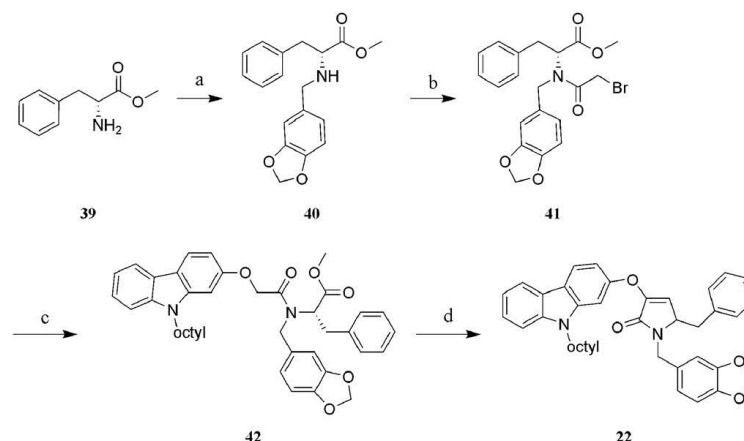
Entry	Compd	Mode of action	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /EC ₅₀ μM		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
20	32	GSI		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
21	33	GSM			H	n.d. ^c	n.d. ^c	32
22	37	GSM			H	n.d. ^c	n.d. ^c	>80
23	38	GSI			H	n.d. ^c	n.d. ^c	80
24	36	GSI		H	H	n.d. ^c	n.d. ^c	104

Modulators (GSM) display increased production of Aβ₃₈ (EC₅₀) and reduction of Aβ₄₂ (IC₅₀). Inverse modulators (iGSM) display increased production of Aβ₄₂ (EC₅₀) and reduction of Aβ₃₈ (IC₅₀). γ-secretase inhibitors (GSI) reduce Aβ₃₈ and Aβ₄₂.

^a EC₅₀ values are displayed.

^b IC₅₀ values are displayed.

^c Not determinable at max concn: 100 μM.

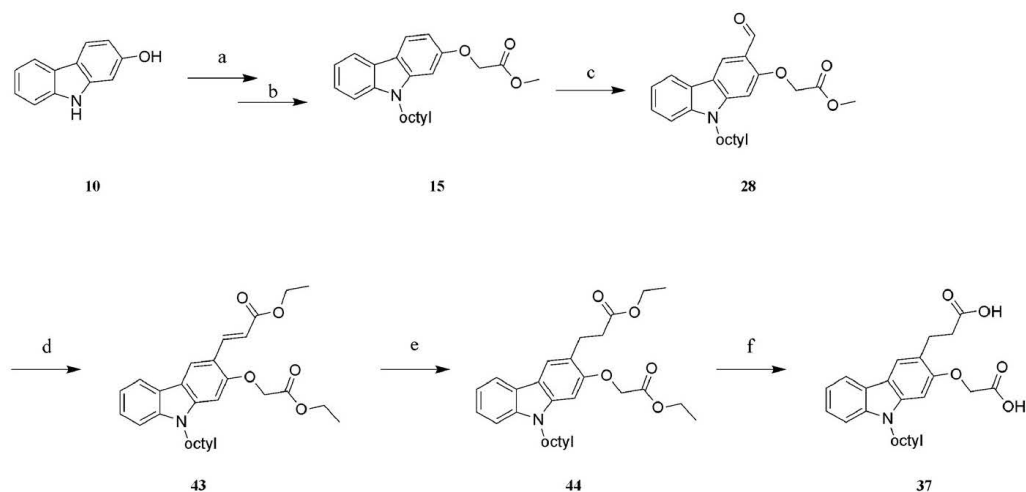


Scheme 3. Reagents: Synthesis of the higher substituted tetramate (**22**). (a) Piperonal, Na(AcO)₃BH, DCE, rt, 5 h; (b) bromoacetyl bromide, TEA, DCM, rt, 2.5 h; (c) **11**, K₂CO₃, acetone, rt; (d) KOtBu, THF, rt.

butyl ester (**16**) increased Aβ₄₂ levels at EC₅₀ = 19 μM. Equally the phosphonic diethyl ester (**27**) caused an increased Aβ₄₂ secretion with an EC₅₀ (Aβ₄₂) = 13 μM. These findings suggest a metabolic activation related to fenofibrate hydrolysis, for example, an esterase releasing the active carboxylic acid. This hydrolysis seems to tolerate short linear esters as substrates. This presumption was confirmed by investigation of the α-branched side chain of carprofen esters (**4**, **6**, and **7**), which inhibit or inversely modulate γ-secretase activity. Consequently, short α,α'-linear esters fulfill criteria for a fenofibrate analog prodrug system in this cellular assay. This potential prodrug system is still under investigation. Finally, an additional aldehyde in the C-3 position (**28**) of the methyl ester was not tolerated and resulted in straight γ-secretase inhibition. All attempts to hydrolyze the phosphonic ester (**27**) resulted in decomposition, excluding the resulting acid from the investigation.

The brain permeability of carboxylic acids is regarded with suspicion despite the identification of the MCT-1 transporter in human brain.²³ Therefore we decided to challenge the paradigm of poor brain permeability of such acids and selected the lead

carprofen derivative **45** (Fig. 1, IC₅₀ Aβ₄₂ = 2.9 μM, IC₅₀ Aβ₄₀ > 40 μM, IC₅₀ Aβ₃₈ = 5.8 μM).¹⁴ It does not interfere with γ-secretase cleavage activity at the ε-site as determined by de novo production of AICD.¹⁴ This indicated that **45** may not exert Notch inhibition at the required physiological concentration. The ratio of the carprofen concentrations in plasma (AUC_F) versus cerebrospinal fluid (AUC_{CSF}) over time was reported for rats (AUC_R = AUC_{CSF}: AUC_F = 0.23), this relates to an AUC_R = 5.31 for flurbiprofen.²⁰ Moreover, Pêhourceq et al. observed a parabolic relationship for brain permeation and the lipophilicity of deprotonated NSAIDs. This relationship stimulated us to select C-10-derivative **45** for in vivo evaluation while the SAR study of the acid derivatives was ongoing. Indeed, **45** showed a slow, yet significant BBB permeation in APP^{swE} Tg mice at a single 10 mg/kg oral dosage suspended in NaCl and gelatine. The plasma and brain concentration of the modulator were monitored over a period of 5 h. The brain concentration was found to continuously increase to a plasma/brain ratio of approximately 2:1 (Fig. 1). The AUC_R < 0.1 indicates reduced brain permeation versus carprofen. Moreover, the significant brain levels of the acid **45** do not imply localization of the compound at



Scheme 4. Reagents: Synthesis of C3-substituted carbazole **37**, (a) Octyl iodide, NaH, THF, DMF, -70°C –rt, 12 h; (b) bromoacetic acid methylester, K_2CO_3 , acetone, rt, 12 h; (c) *N,N*-diisopropylformamide, POCl_3 , H_2O , DCE, 80°C , 2–5 d; (d) phosphonium salt, NaOEt, EtOH, 80°C , 20 h; (e) Pd/C, H_2 , EtOH, HCl, rt, 24 h; (f) KOH, MeOH, rt/ 64°C , 2 d.

the site required for modulatory activity. Furthermore, no significant $\text{A}\beta_{42}$ changes were observed at this timepoint. These unchanged $\text{A}\beta$ levels were linked to the double transgenic mice exhibiting NSAID-resistant PS1 mutations recently.^{15,16} This lack of activity in murine cell lines was reported for several first generation γ -secretase modulators and PS1 mutations both by Weggen et al.²¹ and Steiner et al.²² Thus the less potent and even more lipophilic carbazole derivatives were excluded from evaluation in this mouse model.

Our findings indicate the necessity of an acidic moiety in a pKa-range of 2–5 on this class of γ -secretase modulators. This small pKa-range supports our hypothetical interaction with lysine⁶²⁴. The location of this lysine, directly at the membrane interface close to the GxxxG dimerization motif, suggests a modulation mechanism as an APP dimerization inhibitor or impacts substrate orientation in the membrane¹⁹, shifting the cleavage site to the less toxic $\text{A}\beta_{38}$. The optimum spacer length between the aryl backbone and carboxylic acid was determined to be 2–3 carbon or oxygen atoms. However, introduction of a rigid aryl spacer allowed an elongation of up to four atoms. We identified a potential prodrug system based on short linear esters, which complements the BBB permeation of the free acid **45**.

3. Experimental

3.1. General experimental informations

The ^1H and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker AC 300 (300 MHz) and AC 500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in δ (ppm) adjusted to the central line of the deuterated solvent (MeOD, CDCl_3 , d_6 -DMSO, Acetone- d_6). Mass spectrometry was performed on a Bruker-Franzen Esquire LC mass spectrometer (ESI) and a double focused MAT 95 (EI). HPLC analysis was performed on an Agilent 1100 system.

3.2. Purity determination

Analytical reversed phase high-performance liquid chromatography was performed on an Agilent 1100 HPLC system, equipped

with an auto sampler. The purity of the final compounds was determined using UV detection ($\lambda = 254 \text{ nm}$). The chromatographic method employed the following: column Zorbax Eclipse XDB-C18; $4.6 \times 150 \text{ mm}$; mobile phase A H_2O (0.1% TFA), mobile phase B acetonitrile, flow rate 1 mL/min, gradient elution 30–100% B over 15 min. According to these methods the purities for all compounds were $\geq 95\%$ if not indicated otherwise in the experimental details.

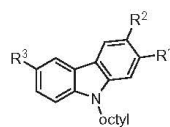
The in vitro measurements were performed on a cellular $\text{A}\beta$ lowering assay, in H4 APP $\Delta 9$ cells to evaluate the compounds for their potency to modulate $\text{A}\beta$ secretion. We used the $\text{A}\beta$ liquid phase electrochemiluminescence (LPECL) assay to measure $\text{A}\beta$ isoforms.^{12,13} Cell viability was measured by a colorimetric cell proliferation assay (CellTiter 96TM AQ assay, Promega) utilizing the bioreduction of MTS (Owen's reagent) to formazan.

See **Supplementary data** for details of the in vivo mouse experiments.

3.3. 2-Hydroxy-N-octylcarbazole **11**

To a suspension of NaH (0.82 g, 20.48 mmol) in THF (20 mL) under argon atmosphere was added 2-hydroxycarbazole (1.50 g, 8.19 mmol) at a temperature of 0°C . After 30 min stirring octylbromide (1.50 g, 7.78 mmol) was added and the reaction mixture was allowed to warm to rt. After 12 h the reaction mixture was quenched by drop wise addition of H_2O until gas formation ceased. The obtained mixture was extracted three times with CH_2Cl_2 (30 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , concentrated in vacuo and purified by silica gel column chromatography (gradient starting with cyclohexane to cyclohexane: CH_2Cl_2 1:2) to give 1.58 g (74%) of **11** (BSc4029) as a colorless solid.

HPLC: 9.2 min (96%), ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.96$ (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.90 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.36 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.19 (td, $J = 7.0, 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.82 (d, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.72 (dd, $J = 8.3, 2.2 \text{ Hz}$, 1H), 4.81–5.43 (b.s., 1H), 4.18 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H), 1.82 (q, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H), 1.20–1.41 (m, 10H), 0.86 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H) ppm, ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 154.7, 141.9, 140.6, 124.4, 123.0, 121.2, 119.4, 118.9, 116.9, 108.4, 108.0, 95.0, 43.1, 31.8, 29.4, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6$, and 14.1 ppm , MS (m/z , 70 eV, ESI) = 318.4 [M^+Na].

Table 2Activity of *N*-octylcarbazole and *N*-octylcarprofen esters

Entry	Compd	Mode of action	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /EC ₅₀ μM		
						Aβ ₃₈	Aβ ₄₀	Aβ ₄₂
1	4	GSI		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	>80
2	6	iGSM		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	15 ^a
3	7	iGSM		H	Cl	n.d. ^b	n.d. ^b	21 ^a
4	15	GSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	27
5	16	iGSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	19 ^a
6	26	GSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	>80
7	27	iGSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	13 ^a
8	28	GSI			H	n.d. ^b	n.d. ^b	89
9	34	GSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	31
10	35	iGSM		H	H	n.d. ^b	n.d. ^b	49 ^a

Modulators (GSM) display increased β production of A₃₈ (EC₅₀) β and reduction of A₄₂ (IC₅₀). Inverse modulators (iGSM) display increased production of x(E₅₀ β) and reduction of A₃₈ (IC₅₀). β-Secretase inhibitors (GSI) reduce A₇₃₈ β and A₄₂.

^a EC₅₀ values are displayed.

^b Not determinable at max concn: 100 μM.

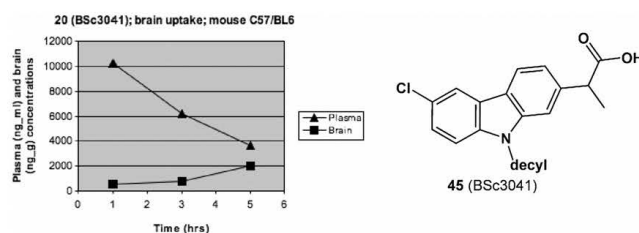


Figure 1. 45 (BSc3041) Penetrate the BBB in C57/BL6 mice at an oral dosage of 10 mg/kg.

3.4. 2-(2-Bromoethoxy)-9-octyl-9H-carbazole **13**

According to general procedure for ether formation (see Supplementary data): **11** (BSc4029) (0.100 g, 0.34 mmol), 1,2-dibromo-

ethane (0.180 g, 0.97 mmol) and K₂CO₃ (0.141 g, 1.02 mmol), acetone (30 mL) yield 80 mg (51%) **13** as colorless solid.

HPLC: 10.8 min (98%), ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.01 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.44–7.35 (m, 2H),

7.24–7.19 (m, 1H), 6.90 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.85 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 4.43 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.74–3.69 (m, 2H), 1.90–1.82 (m, 2H), 1.44–1.23 (m, 10H), 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm, ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 157.3, 141.6, 140.7, 124.6, 122.9, 121.1, 119.6, 118.9, 117.5, 109.5, 107.3, 94.8, 68.6, 43.1, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8, 27.3, 22.6$, and 14.0 ppm.

3.5. 2-(9-Octyl-9H-carbazol-2-yloxy)-ethanesulfonic acid 18

To a solution of **13** (BSc4004) (0.020 g, 0.05 mmol) in a mixture of H_2O (0.050 mL) and dioxane (0.050 mL) was added Na_2SO_3 (0.032 g, 0.25 mmol) and the resulting mixture was heated at 160°C under microwave irradiation until the reaction was completed (TLC control). The reaction mixture was concentrated in vacuo, the resulting solid dissolved in EtOH_{abs} and concentrated in vacuo to give 0.007 g (35%) of **18** (BSc4079) as a colorless solid. HPLC: 7.0 min (93%), ^1H NMR (500 MHz, MeOD): $\delta = 7.97\text{--}7.94$ (m, 1H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.37–7.30 (m, 1H), 7.18–7.10 (m, 1H), 6.84 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.53–4.47 (m, 2H), 3.38–3.33 (m, 2H), 1.89–1.81 (m, 2H), 0.86 (m, 10H), 1.32–1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm, ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD): $\delta = 143.1, 142.0, 125.3, 124.3, 121.8, 120.2, 119.8, 118.2, 109.7, 109.1, 100.5, 95.2, 65.3, 51.9, 43.7, 32.9, 30.7, 30.3, 29.9, 28.2, 23.6$, and 14.4 ppm, MS (m/z , 70 eV, ESI) = 402 [M–].

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmc.2011.06.062.

References and notes

- Beher, D.; Wrigley, J. D.; Owens, A. P.; Shearman, M. S. *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 563.
- Wolfe, M. S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7931.
- Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H. *Neurodegener. Dis.* **2006**, *3*, 275.
- Brunkan, A. L.; Goate, A. M. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 769.
- Kimberly, W. T.; Xia, W.; Rahmati, T.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3173.
- Steiner, H.; Fluhrer, R.; Haass, C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29627.
- Schmidt, B.; Baumann, S.; Braun, H. A.; Larbig, G. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 377.
- Brown, M. S.; Ye, J.; Rawson, R. B.; Goldstein, J. L. *Cell* **2000**, *100*, 391.
- Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Das, P.; Sagi, S. A.; Wang, R.; Pietrzik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Bulter, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E. H. *Nature* **2001**, *414*, 212.
- Kukar, T. L.; Ladd, T. B.; Bann, M. A.; Fraering, P. C.; Narlawar, R.; Maharvi, G. M.; Healy, B.; Chapman, R.; Welzel, A. T.; Price, R. W.; Moore, B.; Rangachari, V.; Cusack, B.; Eriksen, J.; Jansen-West, K.; Verbeeck, C.; Yager, D.; Eckman, C.; Ye, W.; Sagi, S.; Cottrell, B. A.; Torpey, J.; Rosenberry, T. L.; Fauq, A.; Wolfe, M. S.; Schmidt, B.; Walsh, D. M.; Koo, E. H.; Golde, T. E. *Nature* **2008**, *453*, 925.
- Munter, L. M.; Voigt, P.; Harmeier, A.; Kaden, D.; Gottschalk, K. E.; Weise, C.; Pipkorn, R.; Schaefer, M.; Langosch, D.; Multhaup, G. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1702.
- Baumann, S.; Hoettecke, N.; Schubnel, R.; Baumann, K.; Schmidt, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6986.
- Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Baumann, K.; Schubnel, R.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 176.
- Narlawar, R.; Perez Revuelta, B. I.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B.; Baumann, K. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7588.
- Cziri, E.; Leuchtenberger, S.; Dorner-Ciossek, C.; Schneider, A.; Jucker, M.; Koo, E. H.; Pietrzik, C. U.; Baumann, K.; Weggen, S. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 24504.
- Page, R. M.; Baumann, K.; Tomioka, M.; Perez-Revuelta, B. I.; Fukumori, A.; Jacobsen, H.; Flohr, A.; Luebbbers, T.; Ozmen, L.; Steiner, H.; Haass, C. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 677.
- Oehlrich, D.; Berthelot, D. J. C.; Gijzen, H. J. M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 669.
- Richter, L.; Munter, L.-M.; Ness, J.; Hildebrand, P. W.; Dasari, M.; Unterreithmeier, S.; Bulic, B.; Beyermann, M.; Gust, R.; Reif, B.; Weggen, S.; Langosch, D.; Multhaup, G. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 14597.
- Uemura, K.; Farner, K.; Nasser-Ghodsi, N.; Jones, P.; Berezovska, O. *Mol. Neurodegeneration* **2011**, *6*, 15.
- Péhourecq, F.; Matoga, M.; Bannwarth, B. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2004**, *18*, 65.
- Hahn, S.; Bruening, T.; Ness, J.; Cziri, E.; Baches, S.; Gijzen, H.; Korih, C.; Pietrzik, C. U.; Bulic, B.; Weggen, S. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 385.
- Kreiner, B.; Fukumori, A.; Guismedl, A.; Page, R. M.; Luebbbers, T.; Galley, G.; Baumann, K.; Haass, C.; Steiner, H. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 15240.
- Chiry, O.; Pellerin, L.; Monnet-Tschudi, F.; Fishbein, W. N.; Merezinskaya, N.; Magistretti, P. J.; Clarke, S. *Brain Res.* **2006**, *1070*, 65.

3.1.2. Einfluss der Position der Carbonsäureposition auf die γ -Sekretaseaktivität

Einleitung und Motivation

Im vorherigen Kapitel (Kapitel 3.1.1) konnte die Notwendigkeit der Säurefunktion bei Carbazol- und Carprofenderivaten als GSMs gezeigt werden. In einer anschließenden Untersuchung sollte die Position dieser Säurefunktion am Carbazolring variiert werden. Hierfür wurde ein Derivat **98** (BSc4530) entwickelt, welches analog zur Leitstruktur **94** (BSc3030) aufgebaut ist, mit dem Unterschied, dass das Phenol bzw. die Carbonsäurefunktion an Position drei anstatt an zwei lokalisiert ist (Abbildung 49).

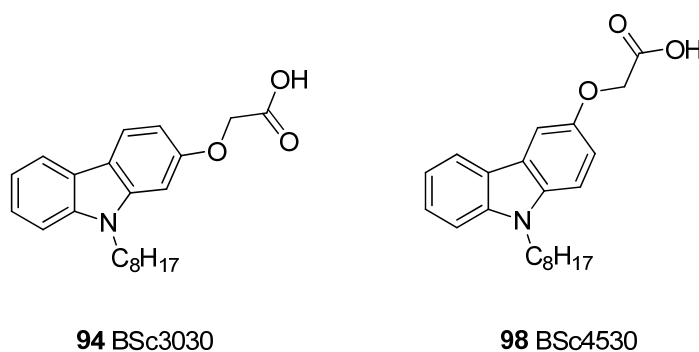


Abbildung 49: Strukturformeln der Leitstruktur (BSc3030) **94** und des geplanten Carbazolderivats (BSc4530) **98**.⁷⁹

Häufig führt eine leichte Änderung in der Konstitution oder Konformation eines Wirkstoffes zu einer deutlich geänderten Aktivität gegenüber dem jeweiligen Target.²⁵³ So könnte die Änderung der Position der Carbonsäurefunktion mit einer gedrehten Orientierung des Moleküls innerhalb der γ -Sekretase bzw. an der Bindungsstelle am APP-Dimer einhergehen, welche die Aktivität beeinflussen würde. Eine Steigerung der modulatorischen Aktivität gegenüber der γ -Sekretase würde diese Position für die zukünftige Entwicklung potenterer GSMs favorisieren.

Synthese des Carbazolderivats **98**

Die Änderung der Carbonsäureposition ist mit deutlich mehr Syntheseaufwand verbunden als die Darstellung der Leitstruktur. Die Alkylierung des Amins und Verseifung der aus Reaktivitätsgründen geschützten Carbonsäurefunktion der Zwischenstufe **99** kann analog den aus vorherigen Derivatisierungen bekannten Syntheseschritten durchgeführt werden. Ein

möglicher Ansatz für den Aufbau des Carbazolgrundgerüsts des Zwischenproduktes **99** stellt ein Palladium-katalysierter Ringschluss in zwei Stufen dar. Dabei wird das Diphenylamin **100** aus Anilin **101** und 2-(4-Bromphenol)essigsäuremethylester **102** dargestellt. Der Ester **102** kann aus 4-Bromphenol **103** synthetisiert werden (Abbildung 50).

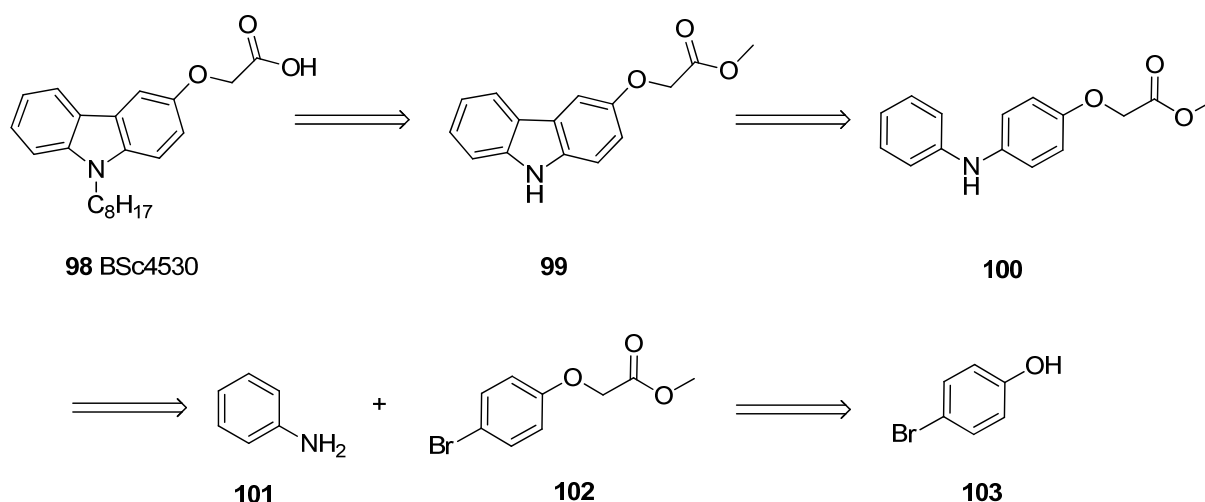


Abbildung 50: Retrosynthetischer Ansatz für die Synthese des Carbazolderivats **98** (BSc4530).

Der für den Ringaufbau des Carbazols **98** benötigte 2-(4-Bromphenol)essigsäuremethylester **102** wurde unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base aus 4-Bromphenol **103** und 2-Bromessigsäuremethylester dargestellt. Dabei wurde das Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten und konnte ohne weitere Aufreinigung direkt nach Extraktion aus der Reaktionslösung weiter umgesetzt werden. Die anschließende Palladium(0)-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung zum Diphenylamin **100** gelang unter vollständigen Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff. Als Katalysatorsystem wurde Palladium(II)acetat und der Diphosphinligand BINAP in 6 mol% sowie die Base Caesiumcarbonat in leichtem Überschuss verwendet. Der eingesetzte Präkatalysator Palladium(II)acetat wird in situ zu Palladium(0) reduziert, wodurch der Katalysezyklus initiiert wird. Durch Verwendung des chelatisierenden Liganden BINAP kann die β -Hydrid-Eliminierung als Nebenreaktion gehemmt werden. Das Zwischenprodukt **100** wurde in einer Ausbeute von 56 % erhalten. In der folgenden Stufe wurde eine C-C-Bindung zum Carbazol **99** geknüpft. Dabei handelt es sich um eine Palladium(II)-katalysierte oxidative Zyklisierung unter Sauerstoffatmosphäre. Das zugefügte Kupfer(II)acetat in 1,5-fachen Überschuss dient zur Reoxidation des gebildeten Palladium(0) zu Palladium(II). Die Reaktion wurde in der Mikrowelle durchgeführt, wobei darauf zu achten ist, dass die Suspension stark gerührt wird, um Überhitzungen durch metallische

Hotspots zu verhindern. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus Essigsäure und Toluol verwendet. Das Toluol, welches alleine nicht für den Einsatz in der Mikrowelle geeignet ist, wurde zugefügt um die Löslichkeit des Eduktes **100** zu erhöhen. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Carbazol **99** als leicht bräunlicher Feststoff in einer Ausbeute von 51 % erhalten. Die Verwendung von Metall-katalysierten Reaktionsschritten ist in der medizinischen Chemie umstritten, da beim finalen Wirkstoff keinerlei Metallspuren enthalten sein sollten. In diesem Fall sind zwei weitere Syntheseschritte an die Palladium-katalysierten Reaktionen angeschlossen, so dass nach insgesamt vierfacher säulenchromatographischer Reinigung davon ausgegangen werden kann, dass keine metallische Verunreinigungen mehr enthalten sind.

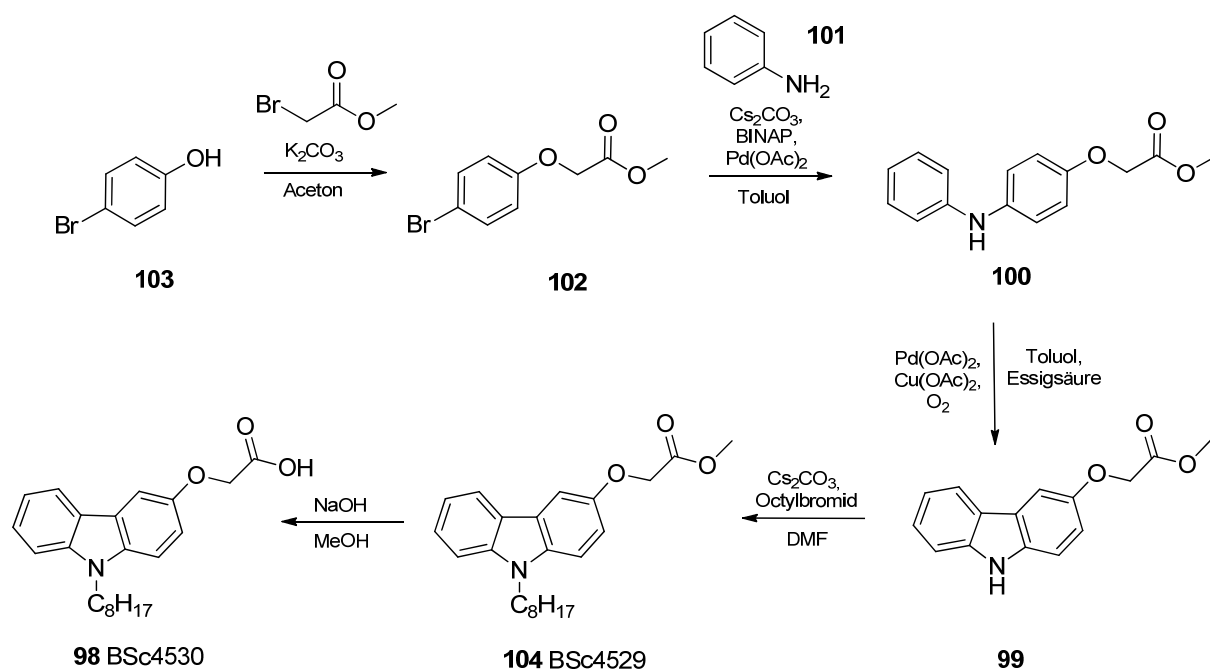


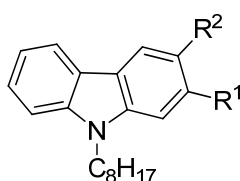
Abbildung 51: Synthese des Carbazolderivats **98** (BSc4530).

Die Alkylierung des Carbazols **99** wurde unter Verwendung von Caesiumcarbonat als Base durchgeführt. Das voraktivierte Aminoanion greift das Octylbromid unter Abspaltung von Bromid nucleophil an. Im letzten Syntheseschritt wird die geschützte Carbonsäurefunktion durch Verseifung mit zweimolarer Natronlauge freigesetzt. Das Endprodukt **98** wurde in einer Gesamtausbeute von 18 % über 5 Stufen in einer Reinheit von 99 % bei UV-Detektion ($\lambda = 254 \text{ nm}$) erhalten.

Biologische Aktivität des Carbazolderivats **98**

Die Aktivität des synthetisierten Carbazolderivats **98** gegenüber der γ -Sekretase wurde in einem zellulären Assay bei der Firma Hoffmann-La Roche bestimmt. Das Assay wird in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Bedingt durch die vertraglichen Kooperationsbedingungen darf hier nur der Inhibitionswert für die Isoform A β ₄₂ gezeigt werden.^{81, 82, 251, 252}

Tabelle 4: Aktivitäten der Leitstruktur **94** und des Amidcarbazolderivats **98**.^{79, 251}



94 BSc3030	R ¹ = OCH ₂ COOH, R ² = H
98 BSc4530	R ¹ = H, R ² = OCH ₂ COOH

Substanz	BSc-Nummer	IC ₅₀ (A β ₄₂) [μ M]	Zelltoxizität [μ M] ^a	Anmerkung
X	3030	19	-	Modulator
X	4530	40	160	-

^a Konzentration mit signifikanter Zelltoxizität.

Der Austausch der Position der Carbonsäurefunktion am Carbazolring führte zu keiner Steigerung der Aktivität gegenüber der γ -Sekretase. Die Bildung der A β ₄₂-Fragmente wurde von BSc4530 **98** lediglich halb so stark inhibiert (IC₅₀(A β ₄₂) = 40 μ M) wie bei der Leitstruktur BSc3030 **94** (IC₅₀(A β ₄₂) = 19 μ M). Da keine Verbesserung der Aktivität erzielt werden konnte, sollte für zukünftige Derivatisierungen das Substitutionsmuster am Carbazolgrundgerüst beibehalten werden.

3.1.3. Untersuchung von PEG- und PPG-Seitenketten als „Membrananker“

Einleitung und Motivation

Die in den vorhergegangenen Kapiteln beschriebene Derivate weisen alle einen Alkylrest auf, der als „Membrananker“ fungieren soll (siehe Kapitel 3.1.1.) Allerdings führt die Einführung dieses unpolaren Strukturelements in mögliche Wirkstoffe zu einer schlechteren Löslichkeit im

physiologischen wässrigen Medium. Eine häufig verwendete Strategie zur Verbesserung der Löslichkeit ist das Ersetzen von unpolaren Funktionen durch Polyethylenglykol (PEG)-Einheiten oder die Einführung zusätzlicher PEG-Seitenketten.²⁵⁴

Ein Austausch der *N*-Alkylseitenkette des GSM **22** (BSc3041) sollte somit zu einer verbesserten Löslichkeit führen. Darüber hinaus wäre aber auch eine zusätzliche Interaktion der neuen Seitenkette mit APP denkbar, die durch den polaren Charakter der PEG-Einheiten hervorgerufen werden könnte. Dieses könnte zu einer gesteigerten modulatorischen Aktivität gegenüber der γ -Sekretase führen.

Für die Ausbildung von Interaktionen des polaren Sauerstoffatoms in PEG mit Aminosäuren von APP müssen die Abstände der einzelnen Sauerstoffatome untereinander zur α -helikalen Struktur des Proteins passen. Dabei ist darauf zu achten, dass eine α -Helix pro Windung 3,6 Aminosäuren aufweist, daraus resultiert ein Abstand von 540 pm zwischen den Windungen.^{255, 256} Wird nun basierend auf den Bindungslängen von Kohlenstoff zu Kohlenstoff (C-C = 154 pm) und Kohlenstoff zu Sauerstoff (C-O = 143 pm) die Länge der PEG-Einheiten berechnet, weisen diese einen Abstand von 361 pm (berechnet mit Chem3D Pro 12.0) von einem Sauerstoffatom zum nächsten, was deutlich zu kurz ist. Dadurch würde maximal alle drei PEG-Einheiten eine neue Interaktion ausgebildet werden, da die anderen Sauerstoffatome zwischen den Windungen liegen würden. Bei PEG würde die Anordnung der Sauerstoffatome einer Taktizität von 1,4 entsprechen.²⁵⁷

Wir nun diese Taktizität hin zu einem 1,5 Abstand, wie es bei Polypropylenglykol (PPG)-Einheiten der Fall wäre, verändert, resultiert hieraus eine Bindungslänge von 478 pm zwischen zwei Sauerstoffatomen. Diese würde deutlich besser zum Abstand der Windungen der α -Helix von APP passen (Abbildung 52).

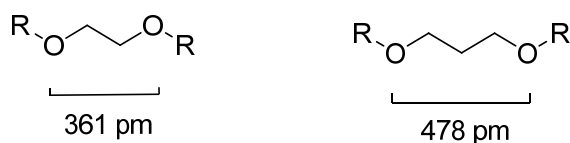


Abbildung 52: Vergleich der Abstände der polaren Sauerstoffatome bei PEG und PPG.

Motiviert durch die dargestellten Überlegungen sollten GSM mit PEG- und PPG-Seitenkette entwickelt werden. In Vorarbeiten wurden bereits drei PEG-Carprofenderivate (**105**, **106**, und **107**) synthetisiert (Abbildung 53). Die biologische Testung zeigte, dass **105**, **106**, und **107** keine Aktivität gegenüber der γ -Sekretase im gemessenen Konzentrationsbereich (bis 80 μM) aufweisen.

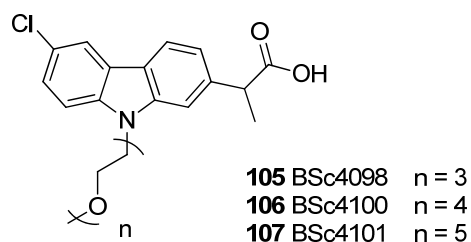


Abbildung 53: In Vorarbeiten synthetisierte PEG-Carprofenderivate **105** (BSc4098), **106** (BSc4100), und **107** (BSc4101).

In dieser Arbeit sollten zum einen die kürzeren PEG-Carprofenderivate **108** und **109** synthetisiert werden, um die Aktivität dieser Derivate und damit die Toleranz der GSM-APP-Bindung gegenüber PEG-Einheiten zu evaluieren (Abbildung 54).

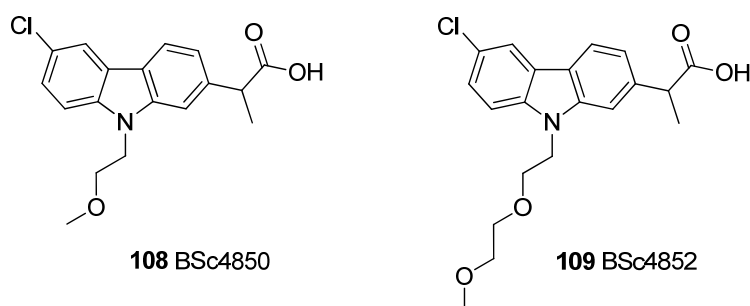


Abbildung 54: Strukturformeln der geplanten PEG-Carprofenderivate (BSc4850) **108** und (BSc4852) **109**.

Zum anderen sollten die entsprechenden analogen PPG-Carprofenderivate **110-114** synthetisiert werden, unter der Annahme, dass diese eine verbesserte Löslichkeit und gesteigerte modulatorische Aktivität aufweisen (Abbildung 55).

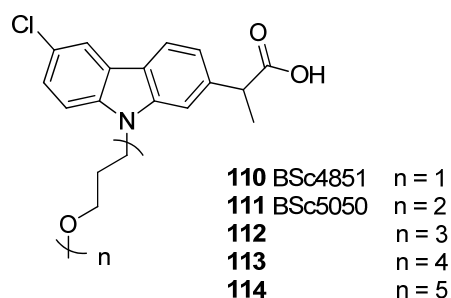


Abbildung 55: Strukturformel der geplanten PPG-Derivate **110** (BSc4851), **111** (BSc5050), **112**, **113** und **114**.

Synthese der PEG-Carprofenderivate **108** und **109**

Die Synthese des Monoethylenglykolderivats **108** und des Diethylenglykolderivats **109** wurde analog zur Synthese der Derivate **105**, **106**, und **107** durchgeführt. Dafür wurde zuerst die reaktionsträge Hydroxyfunktion des entsprechenden Alkohols **115a** oder **115b** in eine bessere Abgangsgruppe für die folgende Substitutionsreaktion überführt. Natriumhydroxid und der jeweilige Alkohol **115a/115b** wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus THF und Wasser in einem Verhältnis von acht zu eins vorgelegt, wobei die Hydroxyfunktion von **115a/115b** deprotoniert wird. Die Zugabe von Toluolsulfonsäurechlorid **116** erfolgte anschließend bei 0 °C, woraufhin die Mischung bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz zu **117** gerührt wurde.

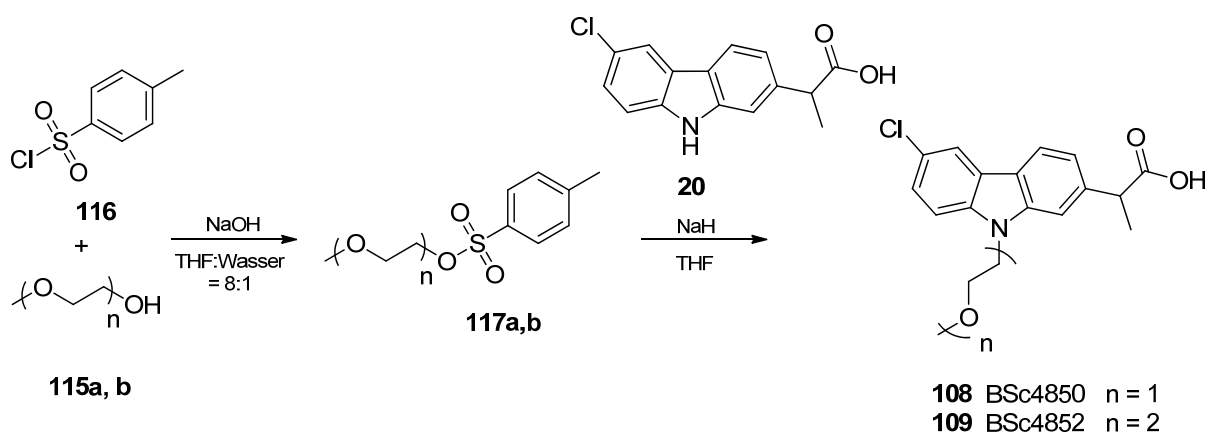


Abbildung 56: Synthese der PEG-Carprofenderivate **108** und **109**. n = 1, 2.

In der folgenden Stufe wurde Carprofen **20** unter Verwendung des Tosylat **117a/117b** pegyliert. Hierfür wurde Carprofen **20** mit Natriumhydrid in THF deprotoniert. Da fünf Äquivalente des Hydrids eingesetzt wurden, ist davon auszugehen, dass sowohl das Amin als auch die Carbonsäure vollständig deprotoniert werden. Die darauffolgende Zugabe von zwei Äquivalenten des aktivierten Alkohols **117a/117b** bei 0 °C führt zwar zur Substitution beider Anionen. Allerdings wird der gebildete Ester unter diesen Reaktionsbedingungen und der folgenden wässrigen Aufarbeitung schnell verseift, weshalb nach säulenchromatographischer Reinigung das *N*-monosubstituierte Produkt **108** der **109** in guten Ausbeuten von 86 % und 90 % erhalten wurde (Abbildung 56).

Synthese der PPG-Carprofenderivate 110 und 111

Die Synthese der PPG-Derivate stellte eine neue Herausforderung dar, da die entsprechenden PPG-Alkohole definierter Länge als Vorläufer nicht kommerziell erhältlich sind. Hierbei wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt, die nachfolgend beschrieben werden sollen.

Eine Verlängerung der einfachen Propanolbausteine, wie z. B. die Veretherung von 3-Methoxypropanol **118** mit 3-Chlorpropanol **119** (Abbildung 57) zu einem Dipropylenglykol **120** wäre zum einen wenig selektiv durchführbar, da das Produkt **120** nahezu die gleiche Reaktivität gegenüber dem Chlorid **119** aufweisen würde wie das eigentliche Edukt **118**.

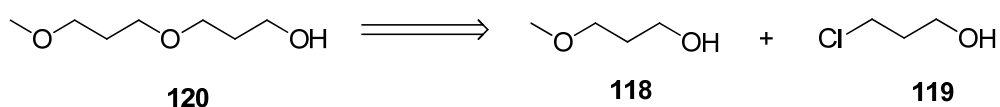


Abbildung 57: Retrosynthetischer Ansatz für die Verlängerung einfacher Propanolbausteine.

Und zum anderen ist der Reaktionsverlauf mithilfe der üblichen Techniken, die im organisch-chemischen Labor zur Verfügung stehen, wie Dünnschichtchromatographie mit UV-Detektion oder Färbung, nicht verfolgbar. Basierend darauf sollte im ersten Ansatz zum Aufbau der PPG-Bausteine eine Schutzgruppe eingeführt werden, die sowohl den selektiven Aufbau ermöglicht, als auch die Detektion des Reaktionsverlaufs durch UV-Aktivität. Hierfür wurde die UV-aktive *p*-Methoxybenzyl (PMB)-Schutzgruppe gewählt, die nur unter oxidativen Reaktionsbedingungen abgespalten werden kann und somit stabil gegenüber vielen anderen Reagenzien ist. Die PMB-Schützung der Hydroxyfunktion sollte analog zu publizierten Reaktionen durchgeführt werden.²⁵⁸ Allerdings konnte sowohl bei Verwendung des PMB-Chlorids als auch des reaktiveren PMB-Trichloracetimidats als Schutzgruppen-Vorläufer und verschiedensten aktivierenden Basen oder Säuren kein Produkt erhalten werden (siehe Tabelle 5). Die Reaktionen wurden jeweils bei Raumtemperatur durchgeführt. Da die parallel durchgeführten weiteren Strategien zum Aufbau der PPG-Bausteine zu diesem Zeitpunkt vielversprechender erschienen, wurde dieser Syntheseansatz nicht weiter verfolgt.

Tabelle 5: Reaktionsansätze für die PMB-Schätzung von 3-Chlorpropanol **119**.

$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (**119**) + $\text{MeO-C}_6\text{H}_4\text{-R}$ (**121**) $\xrightarrow{\quad}$ $\text{MeO-C}_6\text{H}_4\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (**122**)

$\text{R} = \text{Cl}, \text{ } \text{---} \text{O} \text{---} \text{C(=NH)CCl}_3$

Ansatz	Reagenz	Base/Säure	Lösungs- mittel	Reaktions- zeit	Ergebnis
1	PMB-Chlorid	NaH	THF	über Nacht	Kein Produkt
2	PMB-trichloracetimidat	PPTS	DCM	24h	Kein Produkt
3	PMB-trichloracetimidat	CF ₃ COOH	DCM	48 h	Kein Produkt
4	PMB-trichloracetimidat	p-Toluol- sulfonsäure	DCM	48 h	Kein Produkt
5	PMB-trichloracetimidat	PPTS	DCM	48 h	Kein Produkt
6	PMB-trichloracetimidat	Amberlyst 15	DCM	48 h	Kein Produkt
7	PMB-trichloracetimidat	Dowex 50WX8	DCM	48 h	Kein Produkt

Die zweite Strategie sollte eine Verlängerung der PPG-Seitenkette direkt an Carprofen **20** ermöglichen. Dafür wurde zuerst die freie Säurefunktion von Carprofen **20** mit einer Benzylgruppe geschützt, um mögliche nicht kontrollierbare Nebenreaktionen in den folgenden Synthesestufen zu vermeiden. Der Benzylester **123** wurde unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base und Benzylbromid als Reagenz in DMF dargestellt (Abbildung 58).

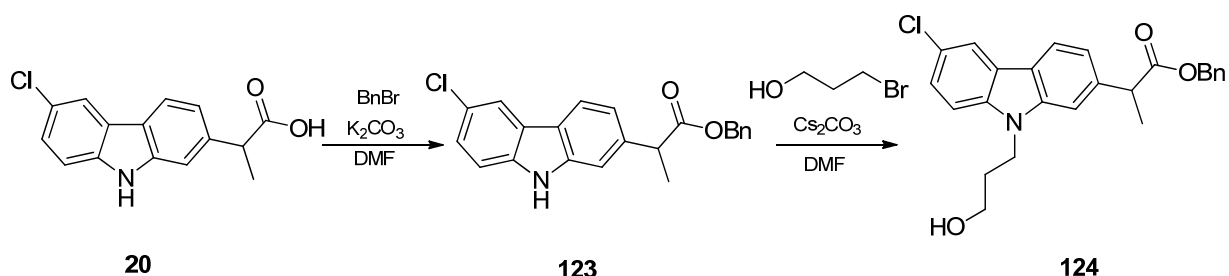


Abbildung 58: Synthese des Benzyl-geschützten Carprofenderivats **124**.

Für die *N*-Alkylierung zum Zwischenprodukt **124** wurde das Amin mit Caesiumcarbonat deprotoniert und anschließend in einer Substitutionsreaktion mit 3-Brompropanol umgesetzt. Eine Verseifung der Esterfunktion mit Natriumhydroxid lieferte das Carprofenderivat **125** (BSc4849), welches ebenfalls biologisch getestet werden sollte, um den Einfluss der endständigen freien Hydroxyfunktion zu evaluieren (Abbildung 59).

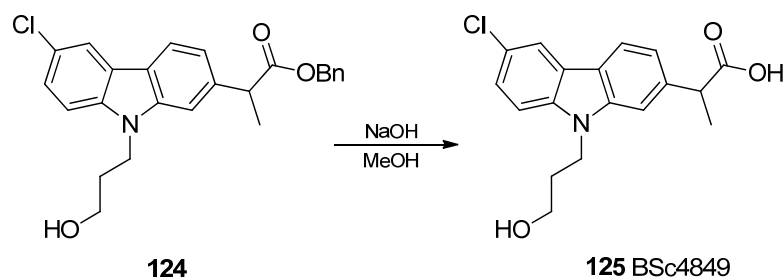
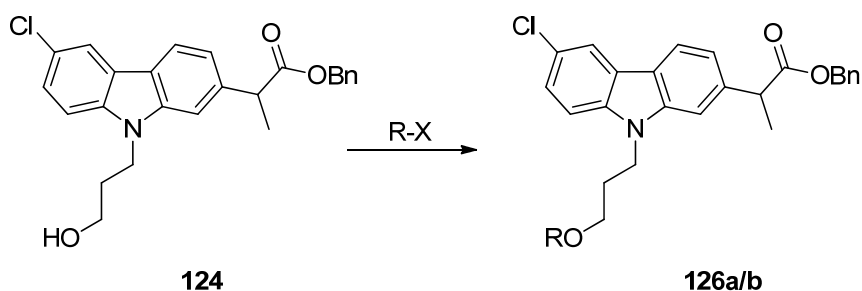


Abbildung 59: Synthese des Carprofenderivats BSc4849 **125**.

Die Seitenkette des Benzyl-geschützten Carprofenderivats **124** sollte mittels Veretherung verlängert werden. Die folgende Entschützung der Carbonsäure wäre mittels Verseifung mit Natriumhydroxid durchführbar. Zunächst sollten durch diese Synthesefrequenz die Carprofenderivate **110** ($n=1$) und **111** ($n=2$) dargestellt werden. Anschließend könnten analog hierzu auch weitere PPG-Bausteine eingeführt werden, um die Derivate **112** ($n=3$), **113** ($n=4$) und **114** ($n=5$) zu erhalten. Für die Darstellung des dipropylierten Benzyl-geschützten Carprofenderivats **126a** wurde das, durch Einführung einer Tosylabgangsgruppe, aktivierte 3-Methoxypropanoltosylat eingesetzt. Die Hydroxyfunktion wurde unter Verwendung von Natriumhydrid bei 0 °C deprotoniert. Nach der Zugabe aller Reagenzien wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei konnte das Produkt **126a** aber nicht erhalten werden. Auch die Darstellung des monopropylierten Benzyl-geschützten Carprofenderivats **126b** durch Methylierung des Vorläufers **124** mit Methyljodid und Natriumhydrid oder Caesiumcarbonat als Base führte bei ähnlichen Reaktionsbedingungen zu keinem Ergebnis (Tabelle 6).

Tabelle 6: Reaktionsansätze für die Veretherung von Carprofenderivat **124**.



Ansatz	R-X	Base	Lösungs- mittel	Reaktions- zeit	Ergebnis
1		NaH	DMF	12 h	Kein Produkt
2	MeI	Cs ₂ CO ₃	DMF	12 h	Kein Produkt
3	MeI	NaH	DMF	12 h	Kein Produkt

Das monopropylierte Carprofenderivat **126b** wurde dann über eine direkte Substitution mit Carprofen **20** erfolgreich synthetisiert. Hierfür wurde 3-Methoxypropanol **118** mit Tosylchlorid **116** zum reaktiveren Zwischenprodukt **127** umgesetzt und anschließend mit **20** substituiert. Das Carprofen **20** wurde mit fünf Äquivalenten Natriumhydrid als Base in THF vorgelegt, wodurch das Amin deprotonieren wird. Gleichzeitig wird die Carbonsäure deprotoniert, welches den eingesetzten Überschuss an Natriumhydrid begründet. Die Zugabe von eineinhalb Äquivalenten tosylierten Alkohol **127** führt sowohl zur *N*-Alkylierung als auch zu einem geringeren Anteil zu einer Veresterung an der freien Carbonsäure als Nebenreaktion. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wird aber der Ester direkt wieder *in situ* verseift und das Carprofenderivat **110** (BSc4851) konnte in einer Ausbeute von 75 % isoliert werden (Abbildung 60).

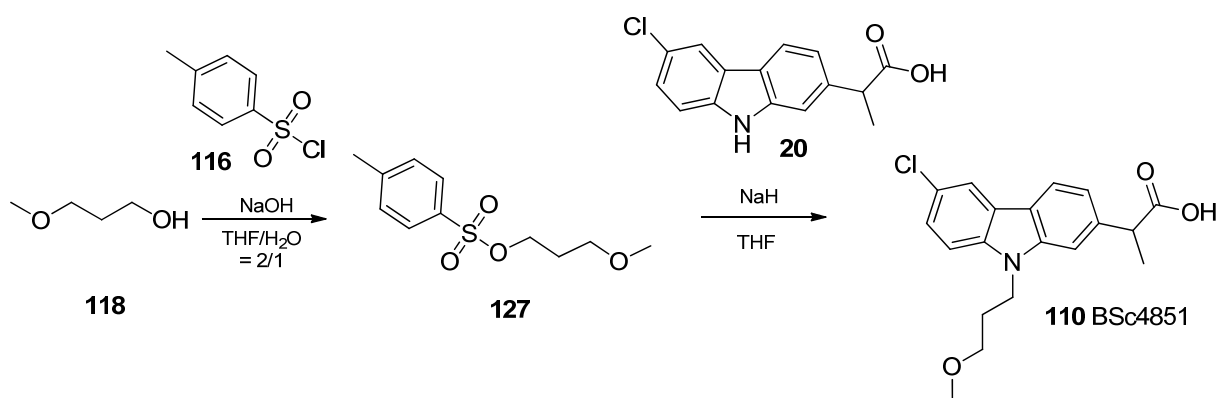
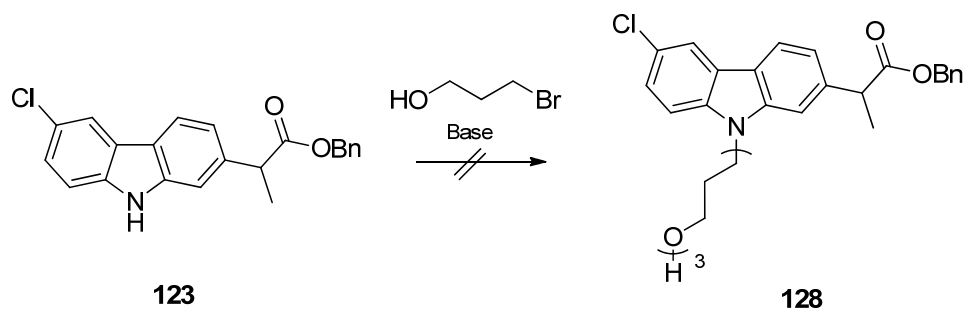


Abbildung 60: Synthese des monopropylierten Carprofenderivats **110**.

Zusätzlich wurden Experimente zur *in situ* Seitenketten-Verlängerung der PPG-Einheiten an Benzylcarprofen **123** durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionsbedingung ähnlich denen in der in Abbildung 58 gezeigten Synthese gewählt. Zugabe von drei Äquivalenten 3-Brompropanol zum Benzyl-geschützten Carprofen **123** sollte zu einem tri-PPG-Derivat **128** führen. Bei Verwendung von Kaliumcarbonat als Base konnte auch nach 7 Tagen keinerlei Umsatz beobachtet werden, während der Einsatz von Caesiumcarbonat zu einem vollständigen Umsatz führte, aber nicht das erwartete Produkt **128** gebildet wurde. Die erhaltene Substanz-Mischung ohne geplantes Produkt **128** wurde nicht weiter analysiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reaktionsansätze für die *in situ* Seitenketten-Verlängerung zu Carprofenderivat **128**.



Ansatz	Äquivalente 3-Brompropanol	Base	Lösungs- mittel	Reaktions- zeit	Ergebnis
1	3	K ₂ CO ₃	DMF	7 Tage	Kein Umsatz
2	3	Cs ₂ CO ₃	DMF	24 h	Vollständiger Umsatz des Edukts, kein Produkt
3	3	Cs ₂ CO ₃	DMF	6 h	Vollständiger Umsatz des Edukts, kein Produkt

Auch diese Strategie der PPG-Verlängerung an Carprofen **20** bzw. Benzyl-geschützten Carprofen **123** wurde daraufhin nicht weiter verfolgt und anstelle dessen der dritte Ansatz für die Synthese der PPG-Derivate entworfen.

In der dritten Synthesepanung zum Aufbau der PPG-Bausteine sollten diese in Anlehnung an eine von Agnelli *et al.* in 2004 vorgestellten Synthese von PPG-Linkern für dimere Aminoglykoside dargestellt werden.²⁵⁹ Die Retrosynthese ist in Abbildung 61 gezeigt. Dabei sollten die PPG-Derivate **111-114** ähnlich zu den PEG-Derivate **105-109** aus den entsprechenden tosylierten Alkoholen **129** und Carprofen **20** aufgebaut werden. Die Vorläufer **130**, der durch Einführung einer guten Abgangsgruppe aktivierten Alkohole **129**, können aus den entsprechenden Allyletherderivaten **131** dargestellt werden. Diese Verlängerung über den Allylether **131** soll durch Reaktion von Allylbromid **132** mit einer PPG-Einheit **133** erzielt werden (Abbildung 61).

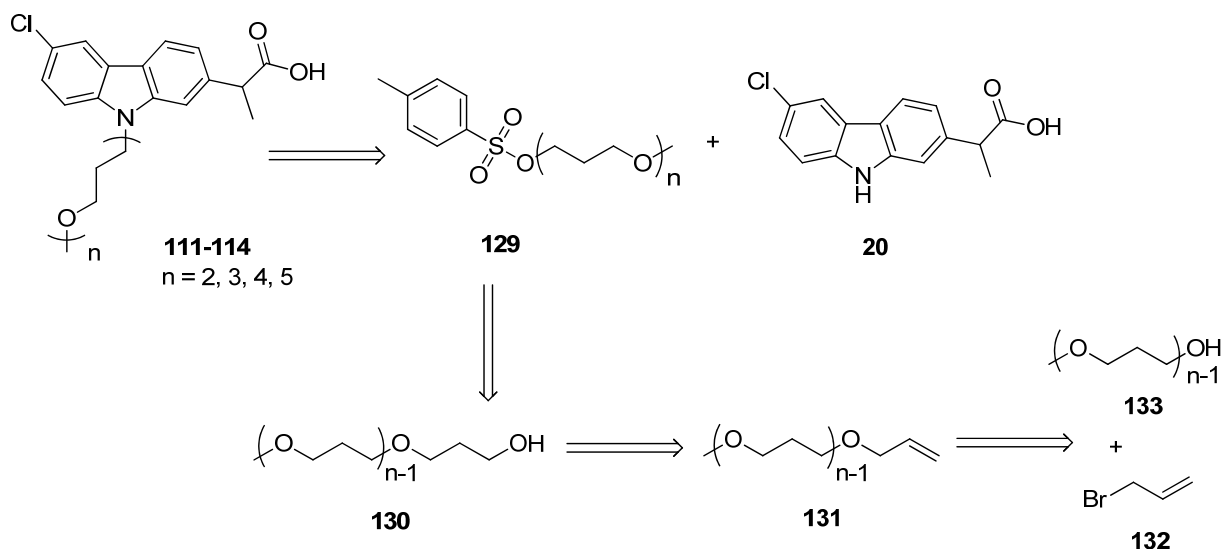


Abbildung 61: Retrosynthetischer Ansatz zur dritten Strategie zum Aufbau der PPG-Derivate **111-114**.

In der ersten Stufe der Reaktionssequenz wurde Allylbromid **132** mit 3-Methoxypropanol **118** unter Anwesenheit von Natriumhydrid und Tetrabutylammoniumiodid in THF verethert. Zur Reinigung wurde das vorher extrahierte Rohprodukt im Hochvakuum destilliert. Dabei konnte der Allylether **131a** in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden. Anschließend wurde das Alken **131a** mit einer einmolaren Boran in THF-Lösung hydroboriert, wofür trockene Bedingungen und Schutzgas notwendig waren. Das hydroborierte Intermediat wurde direkt *in situ* nach drei Stunden Reaktionszeit durch Zugabe von wässriger viermolarer Natronlauge und 35 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung hydrolysiert. Der daraus resultierende Alkohol **130a** konnte in quantitativer Ausbeute erhalten werden (Abbildung 62).

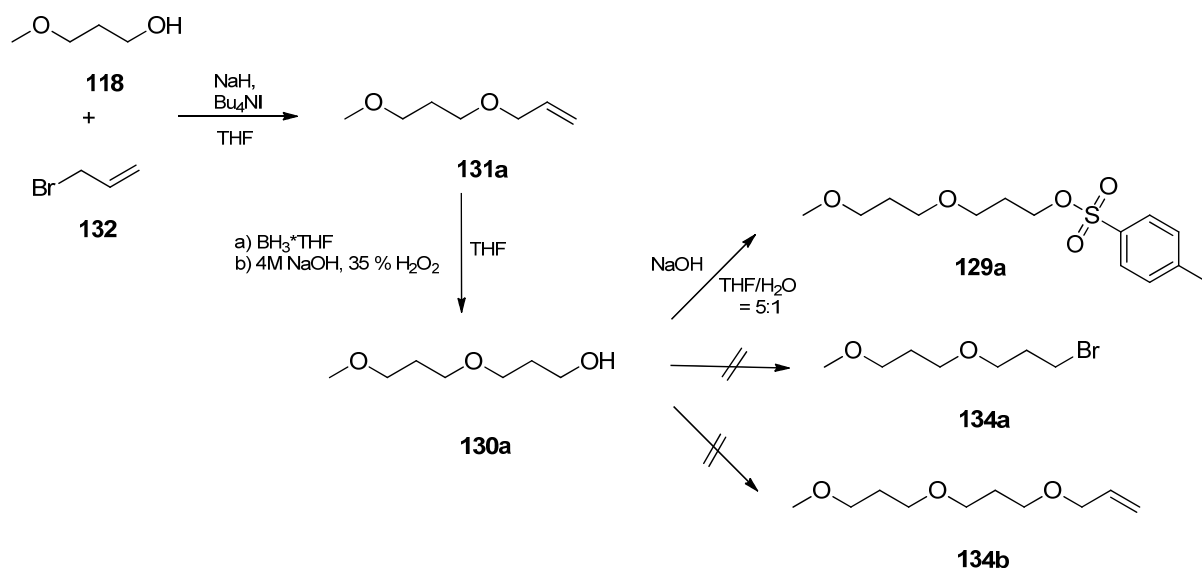
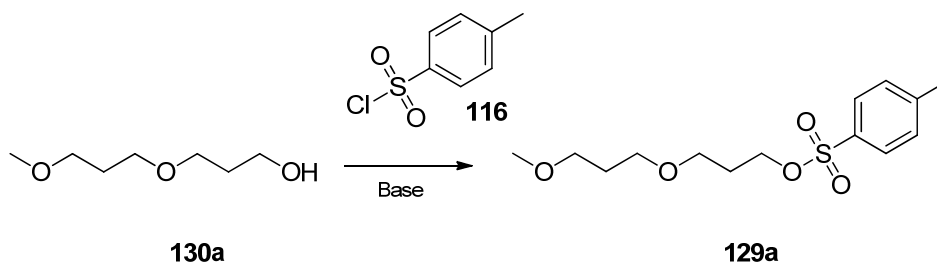


Abbildung 62: Synthese vom Alkohol **130a** und anschließender weiterer Umsetzung zu **129a**, **134a**, **135a**.

Anschließend muss die Hydroxyfunktion des Alkohols **130a** für die Substitution mit Carprofen **20** in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt werden. Ähnlich den vorherigen Synthesen sollte eine Tosylat-Abgangsgruppe eingeführt werden. Hierbei wurde zuerst auf die vorher erfolgreichen Reaktionsbedingungen zurückgegriffen. Allerdings konnte dabei kein Produkt erhalten werden. Auch bei Variation der Basen und Lösungsmittel konnte das Tosylat **129a** nicht dargestellt werden. Die Bedingungen der einzelnen Ansätze sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Lediglich bei Ansatz 8 konnte unter konstanter Kühlung und Aufarbeitung bei maximal Raumtemperatur **129a** in einer Ausbeute von 46 % isoliert werden. Bei einer Wiederholung dieser Synthese war das vorherige Ergebnis nicht reproduzierbar (Tabelle 8). Dies könnte dadurch begründet sein, dass der Alkohol **130a** schon bei kurzer Lagerung zersetzt wird. Insgesamt erscheinen alle Zwischenprodukte der Syntheseabfolge als sehr labil. Eine alternativ zur Tosylierung durchgeführte Bromierung des Alkohols **130a** führte ebenfalls zu keinem Produkt **134a**. Die weitere Verlängerung zum Allylether **134b** wäre denkbar.

Tabelle 8: Reaktionsansätze für die Tosylierung von Alkohol **130a** zum Reagenz **129a**.



Ansatz	Base	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Ergebnis
1	NaOH	THF:H ₂ O =5:1	0 bis RT	Kein Produkt
2	NaOH	THF	0 bis RT	Kein Produkt
3	Pyridin	DCM	0 bis RT	Kein Produkt
4	Pyridin	Pyridin	0 bis RT	Kein Produkt
5	Pyridin	Pyridin	0	Kein Produkt
6	NaH	DMF	0 bis RT	Kein Produkt
7	NaH	DMSO	0 bis RT	Kein Produkt
8	NaOH	THF:H ₂ O =5:1	0	46 %, nicht reproduzierbar

Das bei Ansatz 8 isolierte Tosylat **129a** wurde mit Carprofen **20** unter Verwendung von Natriumhydrid zu BSc5050 **111** umgesetzt (Abbildung 63).

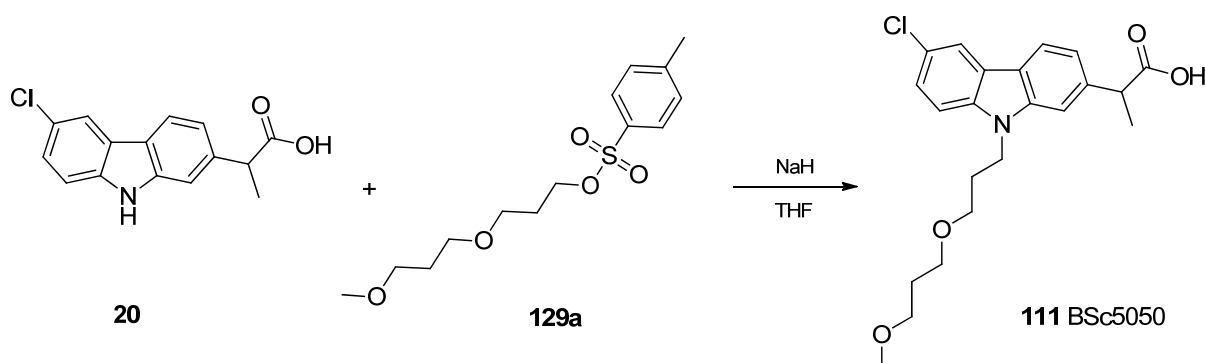


Abbildung 63: Synthese des PPG-Carprofenderivat **111** (BSc5050).

Die Synthese weiterer PPG-Derivate wurde nicht fortgesetzt, da zu diesem Zeitpunkt bereits die Ergebnisse des folgenden Kapitels 3.1.4 vorlagen. Diese Ergebnisse widersprechen den

Hypothesen des „Membranankers“ der Alkylseitenketten und der Ausbildung neuer Interaktionen zwischen PEG-/PPG-Seitenketten von Carprofenderivaten mit der helikalen Struktur von APP.

Auswertung

Insgesamt konnten zwei kurze PEG-Derivate **108**, **109** und zwei PPG-Derivate **110**, **111** synthetisiert werden (Abbildung 64). Da vor der Fertigstellung weiterer Derivate die Ergebnisse der Untersuchung in Kapitel 3.1.4 vorlagen, wurde die Synthese nicht fortgesetzt.

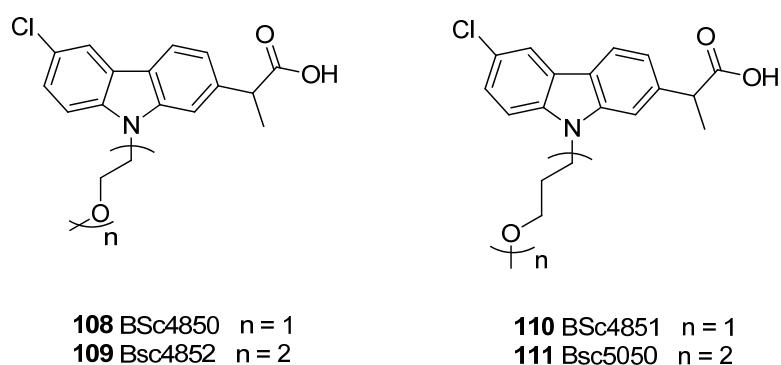


Abbildung 64: Synthetisierte PEG- und PPG-Carprofenderivate **108**, **109**, **110**, **111**.

Die biologische Analyse der in Vorarbeiten dargestellten PEG-Derivate **105**, **106**, und **107** offenbarte, dass diese keine Aktivität gegenüber der γ -Sekretase im gemessenen Konzentrationsbereich (bis 80 μ M) aufweisen. Aufgrund des Ergebnis und der Kenntnis der folgenden Untersuchung wird zu diesem Zeitpunkt keine Aktivitätssteigerung der in diesem Kapitel synthetisierten Derivate **108-111** mehr erwartet. Deshalb wurde die biologische Aktivität nicht evaluiert.

3.1.4. Lokalisation von γ -Sekretase-Modulatoren innerhalb der Membran

Einleitung und Motivation

Motiviert durch die in Kapitel 3.1.1 vorgestellten Überlegungen zur Orientierung der GSMs innerhalb des γ -Sekretasekomplexes sollte diese Hypothese anhand von Untersuchungen von Carprofenderivate in Zellmembranen bestätigt werden. Eine geeignete Technik hierfür ist die Verwendung von Neutronenstreuungsexperimenten, anhand denen Daten über physikalische Eigenschaften von Membranen und Peptiden erhalten werden können. Aus den Ergebnissen können Rückschlüsse auf die Struktur und das dynamische Verhalten von Interaktionen und Anordnungen innerhalb der Membran gezogen werden. Im Vergleich zur Röntgendiffraktion werden bei der Neutronendiffraktion weniger Schäden an der untersuchten Probe verursacht und die erhaltenen Streumuster sind präziser aufgelöst. Zusätzlich können hierbei Deuteriumatome als nahezu isomorphe Markierung benutzt werden, während bei der Röntgenbeugung schwere Atomlabels notwendig sind.²⁶⁰⁻²⁶³

Für die Anwendung in Neutronenbeugungsexperimenten sollen GSMs designt werden, die sowohl in protonierter als auch in partiell deuterierter Form synthetisiert werden können. Durch separate Messung der isotopen Derivate und Vergleich der Streumuster kann auf die Lokalisation der GSMs in der Membran geschlossen werden.

Als Grundgerüst wurde Carprofen **20** gewählt, aus denen über Substitution des Stickstoffs mit lipophilen Resten in protonierter und deuterierter Form neue isotope GSM-Derivate **135** synthetisiert werden können (Abbildung 65). Da die vorherigen Untersuchungen die Notwendigkeit der freien Carbonsäurefunktion bestätigt haben, wurde dieses Strukturmerkmal bei dem Design neuer Derivate beibehalten.

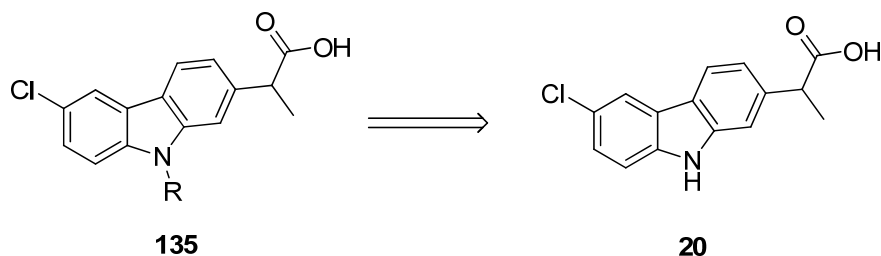


Abbildung 65: Retrosynthetischer Ansatz zur Erstellung von deuterierten Carprofenderivaten. R = Rest, der sowohl in protonierter, wie auch in deuterierter Form dargestellt werden kann.

In Vorarbeiten wurden bereits von Dr. N. Hoettecke zwei Derivate mit Benzyl **136**- und deuteriertem Benzyl-d₇ **137**-Substituenten dargestellt (Abbildung 66).

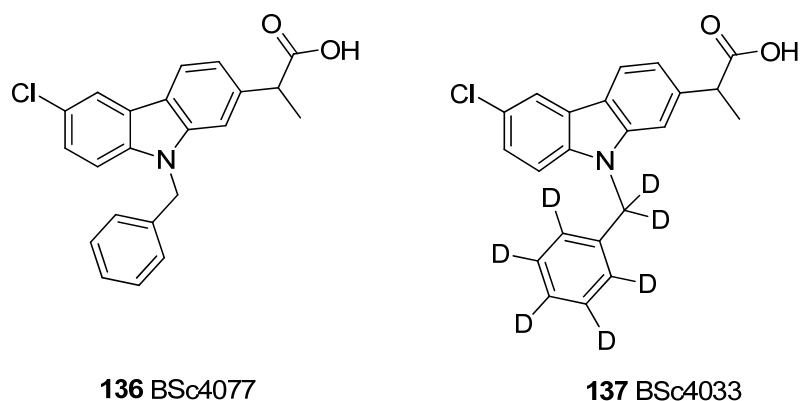


Abbildung 66: Strukturformeln des protonierten *N*-Benzylcarprofens (BSc4077) **136** und des deuterierten *N*-Benzyl-d₇-carprofens (BSc4033) **137**.

Um einen Vergleich zu einem weiteren GSM zu ermöglichen und gleichzeitig ein präziser lokalisierbares Label zu erhalten, wurden zwei Carprofenderivate **138** und **139** entworfen, die sich nur in einer protonierten bzw. deuterierten Methylgruppe unterscheiden (Abbildung 67).

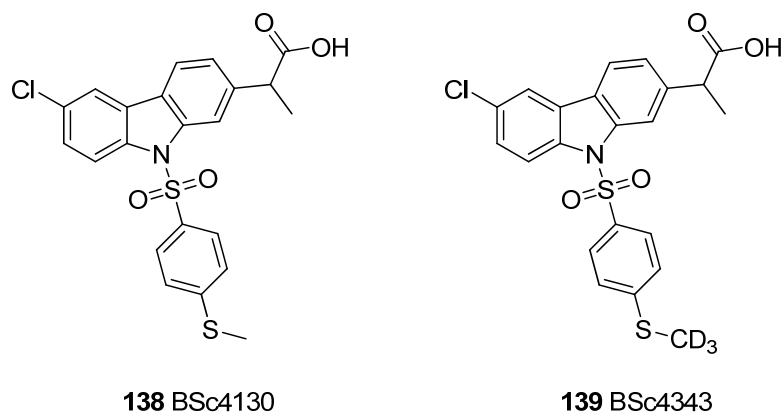


Abbildung 67: Strukturformeln des protonierten 9-(4-(Thioanisyl)sulfonyl)carprofens (BSc4130) **138** und des deuterierten 9-(4-((Methylthio-d₃)phenyl)sulfonyl)carprofens (BSc4343) **139**.

Synthese der Carprofenderivate **138** und **139**

Die Synthesepipeline der Derivate **138** und **139** sieht eine Substitution des Carprofenderivats **123** mit Benzyl-geschützter Säurefunktion mit dem protonierten bzw. deuterierten Sulfonsäurechlorid **140a/b** vor. Das Benzylgeschützte-Carprofen **123** kann aus dem Carprofen **20** erhalten werden, während das Sulfonsäurechlorid **140a/b** in zwei Schritten aus

Thiophenol **141** synthetisiert werden könnte. Diese Syntheseplanung hat den Vorteil, dass die beiden Substanzteile erst in vorletzter Stufe zusammengeführt werden, wodurch die Darstellung der beiden isotopen Derivate erleichtert wird (Abbildung 68).

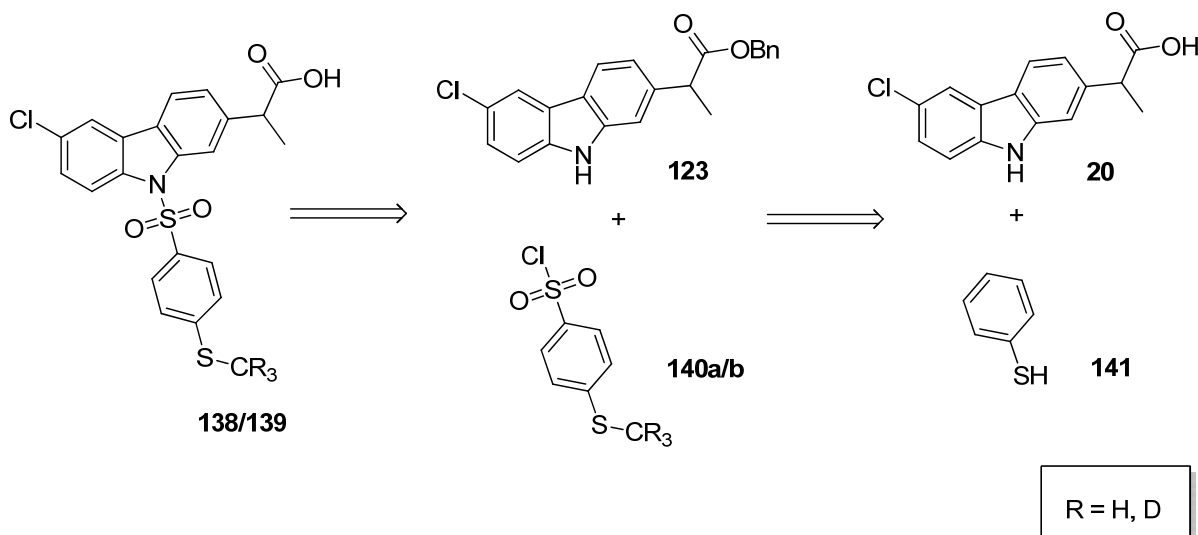


Abbildung 68: Retrosynthetischer Ansatz für die Einführung einer protonierten oder deuterierten Methylgruppe.

Zunächst wurde das protonierte Derivat **138** synthetisiert, um die optimalen Syntheseschritte und Bedingungen der einzelnen Stufen zu evaluieren, bevor das aufgrund der deuterierten Methylgruppe teurere Derivate **139** dargestellt werden sollte. Obwohl Thioanisol **142a** kommerziell erhältlich ist, wurde in Hinblick auf das Einführen des deuterierten Labels beim zweiten Derivat **139** ein Testansatz durchgeführt, in dem Thiophenol **141** mit Methyljodid verethert wurde. Dafür wurde unter Argonatmosphäre Natriumcarbonat als Base in Ethanol suspendiert und Thiophenol **141** zugegeben. Nach Voraktivierung wurde mit leichtem Überschuss Methyljodid zugetropft. Das säulenchromatographisch gereinigte Produkt **142a** wurde in der nächsten Stufe mit Chlorsulfonsäure bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ zum Sulfonsäurechlorid **140a** umgesetzt. Die Reinigung durch Umkristallisation aus Cyclohexan reduzierte die Ausbeute auf 26 %, was aber in dieser frühen Stufe der Synthese noch toleriert werden kann. Die zurzeit günstigste Quelle für Carprofen **20** ist das entzündungshemmende Medikament Rimadyl[®], das zur Behandlung von Arthritis bei Hunden zugelassen ist.²⁶⁴ Die Tabletten enthalten jeweils 100 mg Wirkstoff, welcher durch Lösen der Tabletten in zwei molarer Salzsäure und anschließender Extraktion mit Ethylacetat quantitativ isoliert wurde. Die Schützung des Carprofens **20** wurde nach bekannter Synthesvorschrift mit Benzylbromid in leichtem Überschuss und Kaliumcarbonat als Base durchgeführt. Dabei wurde als Nebenproukt in geringem Anteil das disubstituierte Benzylcarprofen **143** erhalten, welches aber

säulenchromatographisch abgetrennt werden kann. Das Benzyl-geschützte Carprofenderivat **123** wurde in einer Ausbeute von 86 % erhalten.⁷⁹ Die Zusammenführung der beiden Einheiten des Endprodukts **138** wurde in der folgenden Stufe der Synthese unter Verwendung von Natriumhydrid durchgeführt. Hierbei wird Natriumhydrid unter Argonatmosphäre in absolutem THF suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Das zuerst zugegebene Benzylcarprofen **123** wird deprotoniert, woraufhin das Sulfonsäurechlorid **140a** an das Stickstoffanion unter Abspaltung des Chlorids addieren kann. Die im Zwischenprodukt **144a** geschützte Säurefunktion wurde im letzten Schritt der Synthese durch eine Verseifung im basischen Milieu freigesetzt. Eine für biologische Evaluationen notwendige hohe Reinheit von Wirkstoffen wurde durch Aufreinigung der Endstufe **138** mit Hilfe einer automatisierten Säulenchromatographie gewährleistet.

In der Synthese des deuterierten Carprofenderivats **139** wurde die deuterierte Methylgruppe durch Veretherung von Thiophenol **141** mit deuterierten Methyljodid eingeführt. Dabei konnte unter Verwendung der für die vorherige Synthese bereits beschriebenen Bedingungen ein quantitativer Umsatz erhalten werden. Die weiteren Syntheseschritte wurden analog der Synthese des protonierten Carprofenderivats **138** durchgeführt. Das Endprodukt **139** konnte in hoher Reinheit in einer Gesamtausbeute von 20 % über 5 Stufen erhalten werden (Abbildung 69).

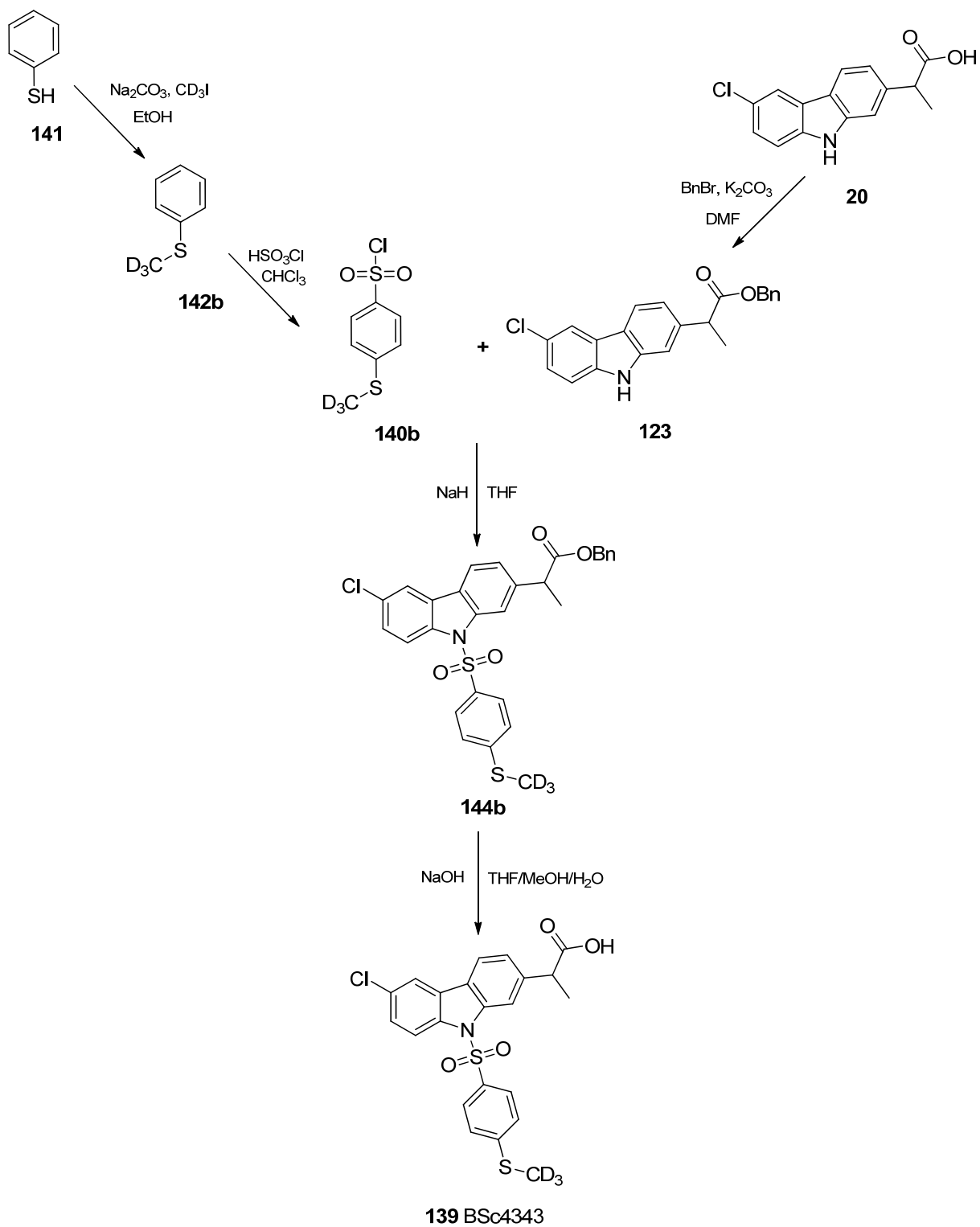
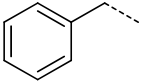
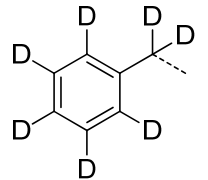
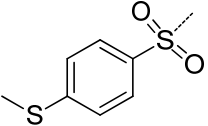
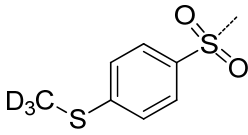


Abbildung 69: Schematische Darstellung der Synthese von BSc4343 **139**.

Biologische Aktivität der Carprofenderivate

Die Aktivität der synthetisierten Carprofenderivate **136-139** gegenüber der γ -Sekretase wurde in einem zellulären Assay bei der Firma Hoffmann-La Roche bestimmt. Das Assay wird in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Bedingt durch die vertraglichen Kooperationsbedingungen dürfen hier nur die Inhibitionswerte für die Isoform A β ₄₂ gezeigt werden.^{81, 82, 251, 252}

Tabelle 9: Aktivitäten der protonierten und deuterierten Carprofenderivate gegenüber der γ -Sekretase.

Substanz	BSc-Nummer	R	IC ₅₀ (A β ₄₂) [μ M]	Zelltoxizität [μ M] ^a	Anmerkung
136	4077		25	-	Modulator
137	4033		17	-	Modulator
138	4130		18	80	Modulator
139	4343		17	80	Modulator

^a Konzentration mit signifikanter Zelltoxizität.

Alle vier aufgeführten Derivate, die für die Untersuchung in Neutronenstreuungsexperimenten entworfen wurden, zeigen gute modulatorische Aktivitäten im niedrigen mikromolaren Bereich (Tabelle 9). Es wurden jeweils die protonierte und deuterierte Form der Derivate

gemessen um den Einfluss des Deuteriumlabels auf die biologische Eigenschaft der Substanzen einschätzen zu können. Deuterium und Protium unterschieden sich auf atomarer Ebene zwar lediglich in einem Neutron, doch können daraus erhebliche physikalische und chemische Isotopeneffekte resultieren. Vergleicht man die Eigenschaften von Deuteriumoxid (D_2O) mit denen von Protiumoxid (H_2O) differieren diese z. B. in der Dichte, Viskosität, Dielektrizitätskonstante, Dampfdruck und Schmelzpunkt. Mitunter dadurch begründet konnten auch Abweichungen im biologischen Verhalten nachgewiesen werden, welche hauptsächlich auf Löslichkeitseffekte oder kinetische Effekte zurückzuführen sind.^{265, 266}

Im Falle der Carprofenderivate scheint der partielle Austausch von Protium zu Deuterium die γ -Sekretaseaktivität kaum zu beeinflussen. Ein Vergleich der beiden Isotopenpaare, zeigt eine marginal gesteigerte Aktivität der deuterierten Derivate **137** ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 17 \mu M$) und **139** ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 17 \mu M$) gegenüber den analogen protonierten Derivaten **136** ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 25 \mu M$) und **138** ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 18 \mu M$). Dieser minimale Unterschied in der biologischen Aktivität kann auf den viel geringeren Unterschied in der molaren Masse der isotopen Carprofenderivate gegenüber dem isotopen Wasser zurückgeführt werden. Somit sollten potentielle biologische Isotopeneffekte durch selektive Deuterierung auch in der folgenden Neutronendiffraktion vernachlässigbar sein.

Lokalisation der GSMs in der Membran durch Neutronendiffraktion

Die Messung der Neutronendiffraktion der GSMs in den Membranen wurde am Helmholtz-Zentrum Berlin durchgeführt. Die Methode ist im experimentellen Teil (Kapitel 5.1.3) beschrieben.

Die Möglichkeit ein deuteriertes Label im Vergleich zu einer protonierten Probe in Neutronendiffraktionsmessung einzusetzen und dadurch auf die Lokalisation des Labels zu schließen, beruht auf der Differenz von mehr als 10 fm in der kohärenten Streulänge (b) von Protium ($b = -3,74$ fm) im Vergleich zu Deuterium ($b = 6,67$ fm). Die kohärente Streulänge beschreibt die Streukraft der Atomkerne eines Elements oder Isotops.²⁶⁷

Die benutzte Modellmembran besteht aus drei Bestandteilen: dem Phospholipid 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin **145** (POPC), dem Sphingolipid Sphingomyelin **146** und Cholesterin **147**, welche im Verhältnis 1 : 1 : 0,67 mol% eingesetzt wurden (Abbildung 70). Die vorliegende Lipidmischung wird als *Lipid Raft* bezeichnet.²⁶⁸

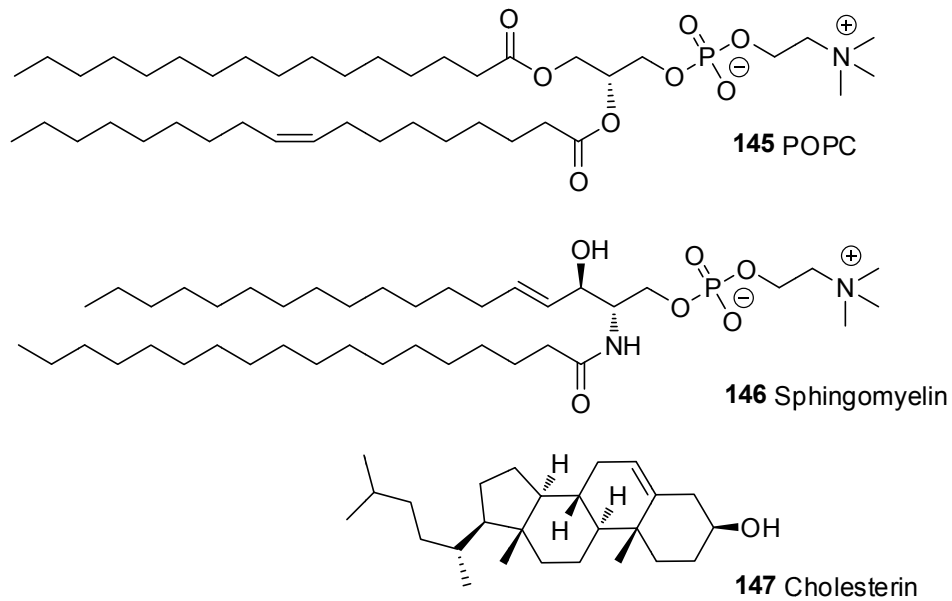


Abbildung 70: Strukturformeln der Bausteine der Modellmembran.^{268, 269}

Vor der Untersuchung der GSM wurde zuerst das Verhalten der Lipide bei einer Temperatur von 15-37 °C untersucht. Hierfür wurden die Positionen der Bragg-Reflexionen der ersten und zweiten Ordnung bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung von 15 °C auf 37 °C gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 71 dargestellt.

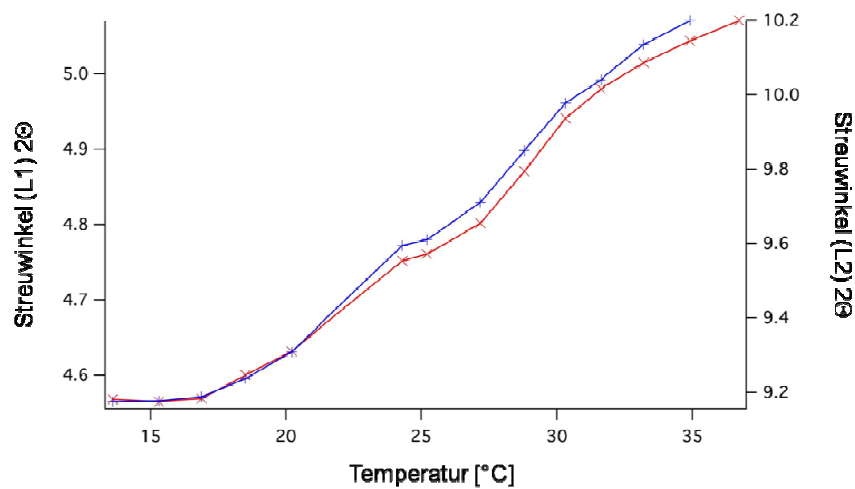


Abbildung 71: Graphische Darstellung der Messung des temperaturabhängigen Verhaltens der Lipide. Rot: Streuwinkel des ersten Braggschen Reflexes, blau: Streuwinkel des zweiten Braggschen Reflexes.

An der Änderung des Streuwinkels 2Θ in Abhängigkeit der Temperatur sind zwei Phasenübergänge erkennbar, der erste tritt bei ca. 20 °C und der zweite bei ca. 30 °C. Diese Phasenübergänge basieren auf der Ordnung der Lipide. So kann eine teilweise geordnete

Lipidschicht in einen vollständig geordneten oder vollständig ungeordneten Zustand übergehen.²⁷⁰⁻²⁷²

Ausgehend von dieser Feststellung wurde das erste Set Röntgendiffraktionen bei einer Temperatur von 15 °C durchgeführt. Hierbei wurde das in Vorarbeiten dargestellte Benzylcarprofenduo **136** und **137** verwendet. Die aus den gemessenen Neutronendiffraktionen kalkulierten Streulängendichte (SLD)-Profile sind in Abbildung 72 dargestellt. Das rote Profil entspricht der Vermessung der Probe mit dem protonierten Benzylcarprofen **136** und das blaue Profil der Probe mit deuterierten Benzylcarprofen **137**. Die Differenz zwischen den beiden Profilen ist in schwarz eingezeichnet.

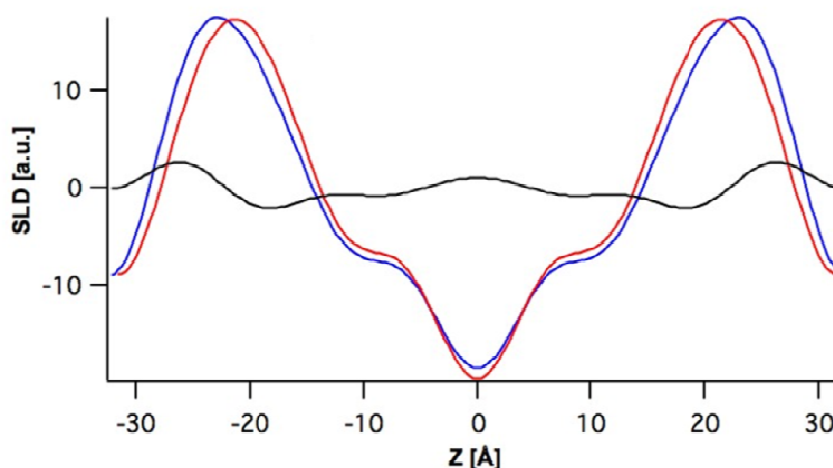


Abbildung 72: Streulängendichte-Profile der Benzylcarprofenderivate **136** (protoniert: rot) und **137** (deutert: blau), sowie der Differenz zwischen den beiden Profilen (schwarz). SLD ist die Streulängendichte in willkürlicher Einheit (a.u., *arbitrary unit*), Z ist der Abstand zur Mitte der Lipid-Doppelschicht in Å.

Aus der Profil-Differenz kann das benutzte d₇-Label geortet werden. Somit ist davon auszugehen, dass der N-Benzylsubstituent der Carprofenderivate **136** und **137** 26.4 Å von der Mitte der Lipid-Doppelschicht (Z) lokalisiert ist, was der Grenze zwischen den Lipidkopfgruppen und der wässrigen Umgebung entspricht.

Im Gegensatz zu den Benzylderivaten **136**, **137** wurde das Sulfonylcarprofenduo **138**, **139** bei zwei unterschiedlichen Temperaturen vermessen. Hierbei wurde analog zur vorherigen Messung 15 °C gewählt, wie auch 37 °C als Endpunkt des Phasenübergangs. Dadurch sollten mögliche Einflüsse der Phasenunterschiede der Lipidmembran auf die Lage der GSMs ermittelt werden.

In Abbildung 73 sind die Streulängendichte-Profile bei 15 °C gezeigt, wobei ebenfalls die Differenz (schwarz) der beiden SLD-Profile des deuterierten (blau) Derivats **139** und des protonierten (rot) Derivats **138** berechnet wurde. Hierbei sind nur geringe Unterschiede im

Bereich von $Z = \pm 20 \text{ \AA}$ sichtbar, welche durch das Methyllabel hervorgerufen werden. Diese Entfernung von der Mitte der Lipid-Doppelschicht entspricht der Höhe des Glycerin-Rückgrats.

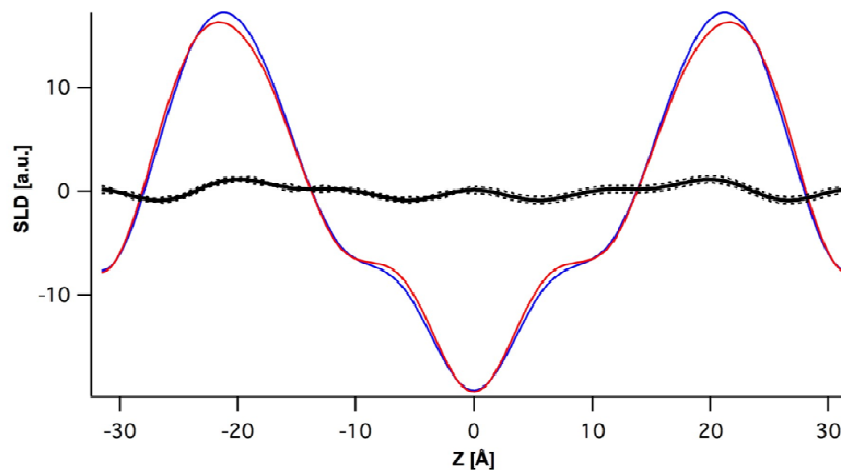


Abbildung 73: Streulängendichte-Profile der Sulfonylcarpfrofenderivate **138** (protoniert: rot) und **139** (deutert: blau), sowie der Differenz zwischen den beiden Profilen (schwarz) bei 15 °C. SLD ist die Streulängendichte in willkürlicher Einheit (a.u., *arbitrary unit*), Z ist der Abstand zur Mitte der Lipid-Doppelschicht in Å.

Die bei 37 °C ermittelten SLD-Profile sind in Abbildung 74 gezeigt. In diesem Fall ist eine deutlich ausgeprägtere Differenz, die durch das deuterierte CD_3 -Label hervorgerufen wird, bei $Z = \pm 16 \text{ \AA}$ vorhanden. Daraus ist ersichtlich, dass die Methylgruppe der vermessenen Sulfonyl-GSMs **138**, **139** in der Nähe des Glycerin-Rückgrats, aber schon an der Grenze der α -Kohlenstoffatome der Alkylketten lokalisiert ist.

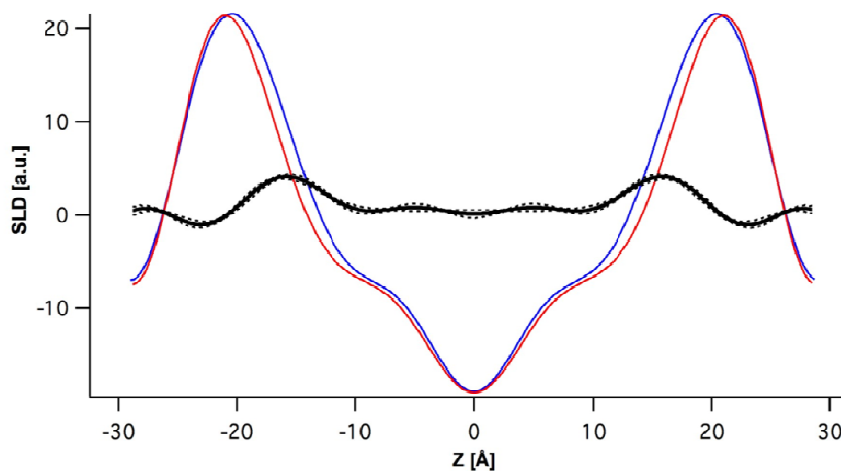


Abbildung 74: Streulängendichte-Profile der Sulfonylcarpfrofenderivate **138** (protoniert: rot) und **139** (deutert: blau), sowie der Differenz zwischen den beiden Profilen (schwarz) bei 37 °C. SLD ist die Streulängendichte in willkürlicher Einheit (a.u., *arbitrary unit*), Z ist der Abstand zur Mitte der Lipid-Doppelschicht in Å.

Beurteilung der Ergebnisse der Neutronenbeugungsmessungen

Ausgehend von der anfangs vorgestellten Hypothese, dass die Säure als Bindungspartner zu APP notwendig ist und der lipophile Alkylrest als „Membrananker“ einerseits den GSM in der Membran stabilisiert und andererseits für die modulatorische Aktivität verantwortlich ist, wurde eine Ausrichtung der Carbazol **23**- und Carprofen **20**-Derivate erwartet, die bildlich betrachtet mit einer in der Membran schwimmenden Ente verglichen werden könnte (siehe Abbildung 75).

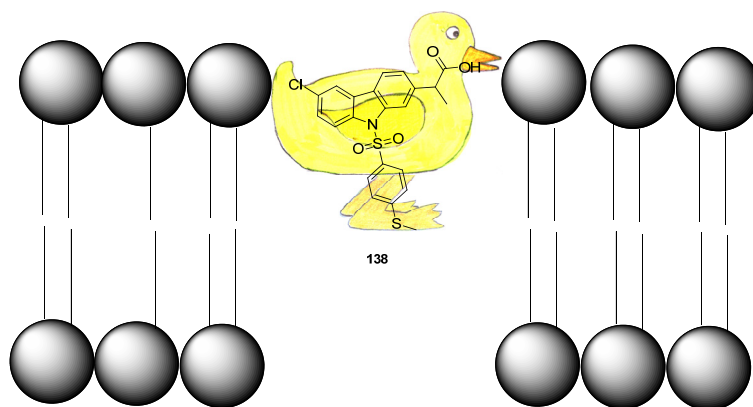


Abbildung 75: Schematische Darstellung der erwarteten Orientierung des Sulfonyl-Carprofenderivats **138** in der Membran.

In den Neutronendiffraktionsmessungen wurde allerdings offenbart, dass das deuterierte Label im oberen Bereich der Membran lokalisiert werden kann. Hierdurch erscheint die vorher aufgestellte Hypothese fraglich. Unter Beachtung der Bindung der Carbonsäurefunktion an APP, was in Kapitel 3.1.1 untermauert werden konnte, wäre vielmehr eine gedrehte Orientierung der untersuchten Derivate **136-139** in der Membran denkbar. Dies würde, in der oben genannten Metapher verbleibend, einer hochkant aufgestellten Ente in der Membran entsprechen, wie es in der Abbildung 76 graphisch dargestellt ist.

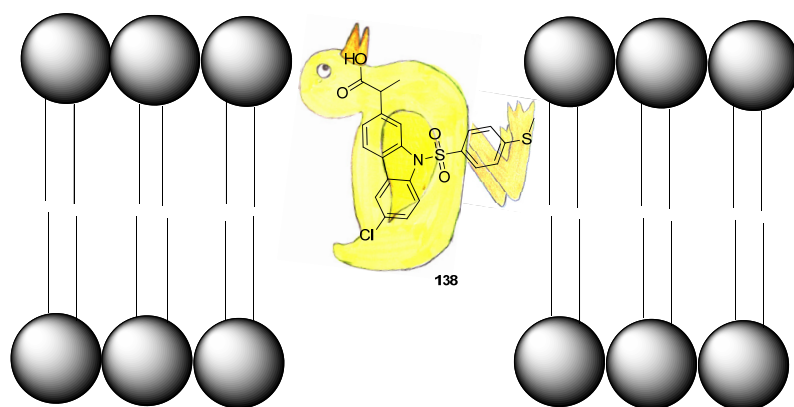


Abbildung 76: Schematische Darstellung der, basierend auf den Ergebnissen der Neutronenbeugungsexperimente, angepassten Orientierung des Sulfonyl-Carprofenderivats **138** in der Membran.

Für das Benzylcarprofen **136**, dessen Label auf Höhe der Grenze zwischen Lipidkopfgruppen und wässriger Umgebung ermittelt wurde, wäre eine vollständig gedrehte Orientierung vorstellbar (Abbildung 77).

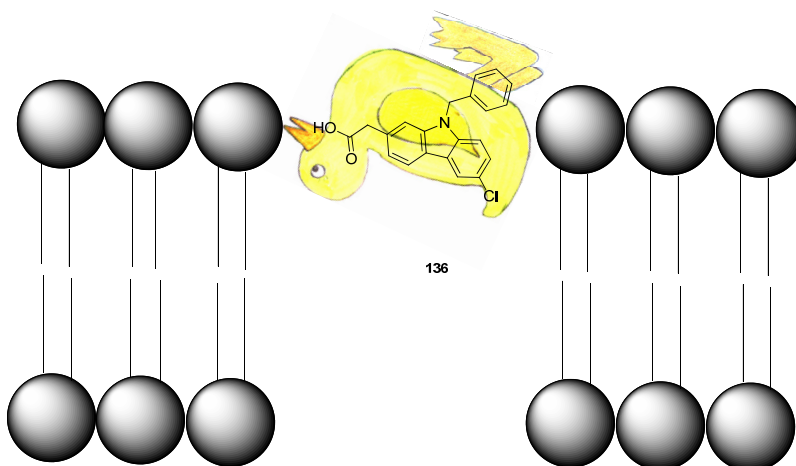


Abbildung 77: Schematische Darstellung der, basierend auf den Ergebnissen der Neutronenbeugungsexperimente, angepassten Orientierung des Benzylcarprofenderivats **136** in der Membran.

Allerdings muss bei der Betrachtung der potentiellen Orientierung der GSMs und der Bewertung der „Membrananker“-Hypothese beachtet werden, dass ggf. eine längliche Alkylseitenkette anders orientiert sein könnte als die hier untersuchten Sulfonyl- oder Benzylseiten-Ketten.

Zusätzlich zur möglichen Orientierung der GSMs in der Membran muss der Unterschied der SLD-Profile der Sulfonyl-Carprofenderivate bei 15 °C im Vergleich zu 37 °C erörtert werden. Da in der zuerst durchgeführten Untersuchung der Phasenübergänge ersichtlich war, dass die Lipide bei 15 °C in einer anderen Ordnung vorliegen müssen, als bei 37 °C, wären zwei

unterschiedliche Erklärungen denkbar. Zum einen könnte die niedrigere Temperatur lediglich dazu führen, dass die GSMs eine verringerte Affinität zu den Lipidmolekülen aufweisen, als bei erhöhter Temperatur. Dies würde auch das Ergebnis der Benzylcarprofenderivate **136** und **137** erklären. Eine zusätzliche Vermessung dieser Proben ist aber aufgrund limitierter Bestrahlungszeiten nicht möglich. Zum anderen könnte eine alternative Erklärung darin bestehen, dass bei 15 °C die Sulfonyl-Carprofenderivate **138** und **139** ausgedehnt in der Membrantiefe verteilt sind, wodurch nur dieses diffuse Signal in der SLD-Differenz erhalten werden würde. Somit wäre die Lokalisierung der GSMs innerhalb der Membran abhängig von der Ordnung der Lipide.

3.1.5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Synthese einiger GSMs auf Basis des Carprofen **20**- oder Carbazol **23**-Grundgerüsts. Anhand der dargestellten Derivate konnte Einblick in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der GSMs erhalten werden.

So hat das Amidderivat **95** (BSc4531) dazu beitragen, die Notwendigkeit einer Carbonsäurefunktion für eine potente modulatorische Aktivität herauszustellen. Dies konnte in Kooperation mit Kollegen des Arbeitskreises von Prof. Schmidt veröffentlicht werden. Des Weiteren wurde die Position der Carbonsäureeinheit am Grundgerüst untersucht. Hierfür gelang diese Synthese des abweichend substituierten Carbazols **98** (BSc4530) mittels Buchwald-Hartwig-Kupplung. Allerdings führte die geänderte Position zu keiner Steigerung der Aktivität.

Ein Teilprojekt, indem PEG- und PPG-Seitenketten als „Membrananker“ untersucht werden sollten, wurde nicht abgeschlossen, da aktuelle Ergebnisse gegen die zu bestätigende Hypothese sprechen. Dennoch wurden hierfür zahlreiche experimentelle Bemühungen unternommen. Hierbei konnten die kurzkettigen Derivate **108-111** erhalten werden.

Zur Identifizierung der Lokalisation von GSMs in der Membran wurden ein partiell-deuterierter GSM **139** und ein protonierter GSM **138** synthetisiert, die sich lediglich in einer isotopen Methylgruppe unterscheiden. Durch separate Vermessung der beiden Derivate **138** und **139** konnte die Differenz der Streulängendichte-Profile berechnet werden und auf die Lage des Labels in der Membran geschlossen werden. Alle durchgeführten Messungen offenbarten, dass die verwendeten Labels auf Höhe der Lipidkopfgruppen oder kurz oberhalb bzw. unterhalb angesiedelt sind. Dadurch konnte die in Vorarbeiten entwickelte Hypothese,

die eine Bindung der Carbonsäurefunktion an APP und eine Orientierung der Alkylkette als „Membrananker“ in die Membran vorhersagt, nicht bestätigt werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten eher auf eine gedrehte Orientierung der eingesetzten GSMs in der Membran hin.

Ausblick

Die Synthese neuer GSMs auf Basis des Carprofen **20**- oder Carbazol **23**-Grundgerüsts scheint nicht sinnvoll, da bereits deutlich potentere GSM, die auf anderen Grundgerüsten basieren, entwickelt werden konnten.

Das nach wie vor größte Problem bei der Entwicklung potenterer GSMs ist die Unkenntnis der Proteinstruktur und des genauen Mechanismus der zur Modulation führt. Weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Orientierung der GSMs in der Membran könnten zum Verständnis beitragen. Hierfür wären sowohl NMR-Experimente an Membran-Proben mit GSM als auch die Synthese von GSMs mit z. B. fluoreszenten Label, die direkt mikroskopisch untersucht werden könnten, denkbar.

Zusätzlich sollten die bisher eruierten Methoden und Synthesestrategien für die Darstellung neuer Wirkstoffe, auf Basis ähnlicher Grundgerüste, für andere Targets adaptiert werden. Dies wurde bereits für die Kinase DYRK1A angewendet und wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

3.2. Entwicklung und Evaluation neuer DYRK1A-Inhibitoren

Im Anschluss an die Synthese und Untersuchung von Carbazolderivaten als γ -Sekretase-Modulatoren sollte nun das biologische Potential dieser Substanzklasse auf die Inhibition eines zweiten Targets evaluiert werden. Die Kinase DYRK1A wird ebenfalls in Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz gebracht und stellt somit ein wichtiges Zielprotein zur Behandlung von AD dar. Zusätzlich basiert der nach aktuellem Stand der Forschung aktivste und oral bioverfügbare DYRK1A-Inhibitor Harmin **25** auf einem Carbazol-analogen Grundgerüst, welches als Leitstruktur für neue Derivate genutzt werden kann. Die Entwicklung und Synthese, sowie biologische Evaluation neuer DYRK1A-Inhibitoren wird im Folgenden vorgestellt.

3.2.1. Entwicklung eines computergestützten Modells für das Design neuer DYRK1A-Inhibitoren

Einleitung und Motivation

Für das Design neuer Inhibitoren kann auf verschiedene computerbasierte Methoden zurückgegriffen werden. Diese können in zwei Hauptklassen eingeteilt werden: Die Liganden-basierten und die Struktur-basierten Methoden.²⁷³

Für das Liganden-basierte Modeling sind Datenbanken mit möglichst vielen aktiven und inaktiven Substanzen, die den gleichen Bindungsmodus in Bezug auf ein bestimmtes Target aufweisen und gleichzeitig strukturell möglichst unterschiedlich sein müssen. Daraus können Pharmakophormodelle berechnet werden, die gemeinsame Charakteristika der bekannten Inhibitoren identifizieren. Anhand eines solchen Modells kann die Aktivität möglicher neuer Inhibitoren noch vor der Synthese abgeschätzt und somit die Planung neuer Wirkstoffe optimiert werden.

Das Struktur-basierte Modeling ist nur bei Kenntnis der Proteinstruktur möglich. Im Falle von DYRK1A gelang Ogawa *et al.* in 2010 die Kokristallisation des Proteins mit dem β -Carbolin Harmin **25**.⁹⁴ Die Proteinstruktur (PDB: 3ANR) und deren aktive Tasche wurden bereits in der Einleitung vorgestellt, genauso wie der Inhibitor Harmin **25** (Kapitel 1.3). Durch Kenntnis des Bindungsmodus vom Liganden Harmin **25** an den Rezeptor DYRK1A können auch mögliche Interaktionen neuer Wirkstoffe und deren Bindungsmodi vorhergesagt werden, ohne vorherige kristallographische Analyse. Anhand des Struktur-basierten Modelings kann somit auf Interaktionen und sterische Beeinflussungen durch mögliche Derivatisierungen eines

bekannten Inhibitors geschlossen werden, wodurch das Design neuer Inhibitoren erleichtert wird.

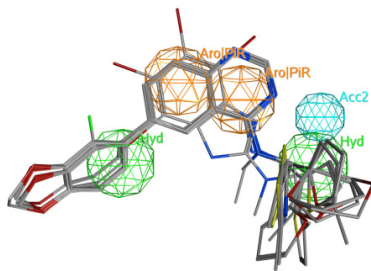
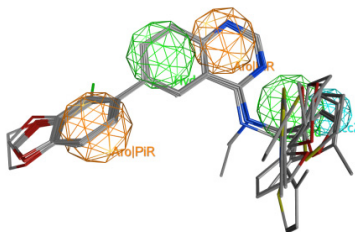
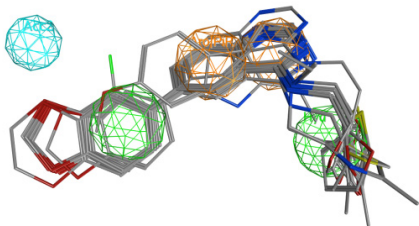
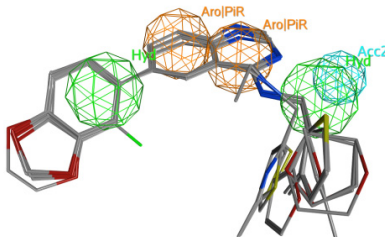
Da beide beschriebenen computerbasierten Methoden den Synthesaufwand durch vorherige Aktivitätsabschätzungen reduzieren können, sollten vor der Darstellung potentieller neuer DYRK1A-Inhibitoren ein Pharmakophormodell und ein Struktur-basiertes Docking erstellt werden. Hierfür wurde die *Molecular Operating Environment*-Software (MOE) benutzt.²⁷⁴ Diese computergestützten Berechnungen wurden in Kooperation mit C. Scholz durchgeführt.

Das Pharmakophormodell

In diesem Kapitel soll zuerst die Erstellung des Pharmakophormodells erläutert werden. Anschließend wird das daraus erhaltene Modell und die auf dieser Basis identifizierten gemeinsamen Charakteristika der als Referenz verwendeten DYRK1A-Inhibitoren beschrieben. Für die Berechnung des Modells mit MOE wurde die Datenbank *bindingdb.org* benutzt, die 228 Einträge zu DYRK1A-Inhibitoren mit den jeweils bestimmten biologischen Aktivitäten bereitstellt.²⁷⁵ Daraus wurden 27 aktive DYRK1A-Inhibitoren ($IC_{50} \leq 250$ nM) und 100 gegenüber DYRK1A inaktive Substanzen ($IC_{50} \geq 10$ μ M) ausgewählt. Diese Gruppe wurde in ein Trainingsset (2/3), zum Erstellen des Pharmakophormodells und ein Testset (1/3) zur Bestätigung des Modells aufgeteilt. Dabei wurde auf eine möglichst gleichmäßige Aufteilung der unterschiedlichen Grundstrukturen und Aktivitäten geachtet.

Zunächst werden mit der Funktion ConfImport von MOE Konformationsdatenbanken der Substanzen erstellt, woraufhin die Software eine möglichst ähnliche räumliche Ausrichtung aller aktiven Substanzen berechnet. Danach werden hieraus mögliche Pharmokophormodelle erstellt, die alle gemeinsamen strukturellen Merkmale der aktiven Inhibitoren aufweisen. Dabei können bestimmte Eigenschaften vorgegeben werden, die berücksichtigt werden sollen. Bei den durchgeführten Analysen wurden aromatische Ringe, Wasserstoff-Akzeptoren und -Donoren und ein Maximum von drei hydrophoben Zentren zugelassen. Weiterhin wurden vorgegeben, dass die Modelle fünf Eigenschaften beinhalten und mindestens 80 % der aktiven Substanzen dem jeweiligen Modell entsprechen sollen. Als Ergebnis wurden insgesamt sieben unterschiedliche Modelle erhalten. Zusätzlich wurde die Präzision des Modells anhand aller Substanzen des Trainingssets kalkuliert, die hierfür verwendete Formel lautet: $Acc = m/N$ (Acc - accuracy, Präzision, m - Anzahl der passenden aktiven Substanzen und nicht passenden inaktiven Substanzen, N – Anzahl aller Substanzen im Trainingsset). Nur die vier Modelle mit einer Genauigkeit $Acc \geq 0.8$ wurden mit dem Testset aus neun aktiven und 32 inaktiven Inhibitoren evaluiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammenfassung der vier Pharmakophormodelle mit einer Präzision $\geq 80\%$.

Modellnummer	Präzision (Acc)	RMSD ^a	Pharmakophormodell ^b
1	0.8140	0.7296	
2	0.8140	0.7369	
3	0.8023	0.6505	
4	0.8023	0.6542	

^a Wurzel der quadratischen Abstände der Eigenschaft aller Liganden zum Mittelpunkt der Eigenschaft im Pharmakophormodell in Å, ^b graphische Darstellung der berechneten vier Pharmakophormodelle (Acc > 80 %) mit den aktiven Liganden des Testsets. Grüne Kugel: hydrophobe Region, türkise Kugel: Akzeptorprojektion, orangene Kugel: aromatisches System, grau: Kohlenstoffatome, rot: Sauerstoffatome, blau: Stickstoffatome, gelb: Schwefelatome.

Da alle vier Modelle auch mit dem Testset eine hohe Treffsicherheit von 90 % aufwiesen, wurden die *root of mean square distances* (RMSD)-Werte aller aktiven Inhibitoren des Testsets als Entscheidungskriterium mit in Betracht gezogen. Die RMSD-Werte geben den mittleren Abstand der funktionellen Gruppen der Liganden zum Mittelpunkt des entsprechenden Merkmals im Modell an. Je kleiner der RMSD-Wert ist, umso besser passt das Modell zu den Liganden.

Das am besten bewertete Pharmakophormodell -Modell 3- ist mit eingebettetem DYRK1A-Inhibitor Harmin **25** in Abbildung 78 dargestellt. Damit soll veranschaulicht werden, welche Merkmale von Harmin **25** in ähnlicher Form auch bei strukturell unterschiedlichen Inhibitoren vorhanden sind.

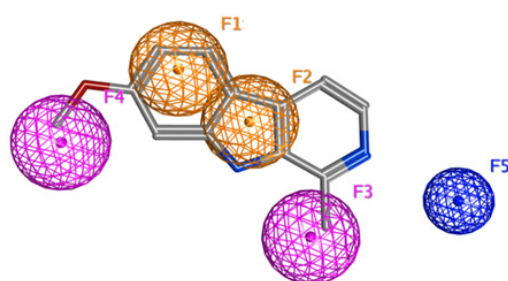


Abbildung 78: Das am besten bewertete Pharmakophormodell inklusive angepasstem Harmin **25**. Lila Kugel: hydrophobes Zentrum, orangene Kugel: aromatisches System, blaue Kugel: Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor-Projektion.

Das Modell weist zwei aromatische Features F1 und F2 (orangene Kugeln) auf, die durch das Indol-Grundgerüst des β -Carbolin **25** dargestellt werden. Die beiden hydrophoben Features F3 und F4 werden jeweils von einer Methylgruppe ausgefüllt. Das Feature F3 wird durch die Methylgruppe des Pyridinrings wiedergespiegelt, während die Methylgruppe in F4 von der Methoxyfunktion am Indol stammt. Das fünfte Merkmal ist eine Akzeptorprojektion, welche die Richtung aufzeigt, in die ein Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptor orientiert ist. Bei DYRK1A entspricht der Donor Lysin 188 dieser Akzeptorprojektion und das Stickstoffatom des Pyridinrings bildet mit dem Donor eine Wasserstoffbrückenbindung als Akzeptor aus.

Struktur-basiertes Docking von β -Carbolinen in die ATP-Tasche von DYRK1A

Für das Struktur-basierte Docking wurde zuerst die in der Proteindatenbank bereitgestellte Proteinstruktur von DYRK1A einschließlich gebundenem Harmin **25** erstellt (PDB: 1ANR). Um die Pharmakophor-basierte Docking-Methode zu testen wurde der Ligand Harmin **25** in

die ATP-Tasche von DYRK1A gedockt. Die Docking-Methode wird in Kapitel 5.1.4 beschrieben. Ein Vergleich der Bindungsmodi bzw. der berechneten freien Bindungsenthalpien (*scores*) sowie der Orientierung des Liganden mit den Daten aus der Röntgenkristallstrukturanalyse ermöglicht eine Bewertung der von MOE erstellten Ergebnisse. Die Beurteilung erfolgte anhand dreier Kriterien: der *Scoring*-Funktion London dG, der *Scoring*-Funktion DSX^{CSD} und den RMSD-Werten. Die *Scoring*-Funktion London dG basiert auf fünf Komponenten: Änderungen der Rotations- und Translationsentropie (*c*), Energieänderung durch Verlust von Flexibilität (*E_{Flex}*), Energiebeiträge basierend auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken (*E_{H-Bond}*), Beiträge aus Metallkomplexierungen (*E_{M-Lig}*) und Energieänderungen aus der Desolvatisierung von Atomen (*D_{atom}*).

Aus vorhergegangenen Dockingstudien war bereits bekannt, dass die Konformation, welche der nativen am ähnlichsten ist, nicht zwangsläufig die Konformation mit dem bestbewerteten London dG-Score sein muss. Deshalb wurde zusätzlich die DSX^{CSD}-Funktion als Bewertungskriterium herangezogen. Diese *knowledge*-basierte *Scoring*-Funktion setzt sich aus der Summe statistischer Potentiale zusammen, die aus der CSD-Datenbank mit bekannten Protein-Liganden-Komplexen errechnet werden.²⁷⁶ Dadurch werden die natürlichen Bindungsgeometrien meist besser wiedergegeben, als durch empirische *Scoring*-Funktionen, wie z. B. die London dG-Funktion. Das dritte Kriterium, die RMSD-Werte, geben die Abweichung der Atome des gedockten Liganden zu denen aus der Röntgenkristallstrukturanalyse an. Im Optimalfall, wenn der gedockte Ligand identisch zum experimentell bestimmten Liganden orientiert ist, würde der RMSD-Wert bei null liegen. In Tabelle 11 sind die drei Kriterien für die sieben besten Konformationen des Dockings zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Bewertungskriterien des Dockings von Harmin **25** in die Proteinstruktur von DYRK1A.

Konformation	London dG [kcal/mol]	DSX	RMSD [Å]
1	-9.3105	-125.5	0.3202
2	-9.4071	-118.0	0.4643
3	-8.6095	-112.8	2.2775
4	-7.4453	-95.40	4.4098
5	-9.1627	-106.4	5.3321
6	-9.9962	-97.11	5.3487
7	-10.475	-105.3	5.3723

^a RMSD zum experimentell bestimmten Liganden.

Die beiden ersten Konformationen weisen nahezu die native Orientierung auf, was an den niedrigen RMSD-Werten ersichtlich ist. Zusätzlich zeigt sich dies auch in der graphischen Darstellung. Werden in MOE die natürliche Struktur des Liganden Harmin **25** zum Protein DYRK1A und die Konformation 1 (RMSD = 0.32 Å) der Docking-Ergebnisse übereinander gelegt, ist die sehr gute Überlappung der beiden Liganden deutlich zu erkennen (Abbildung 79).

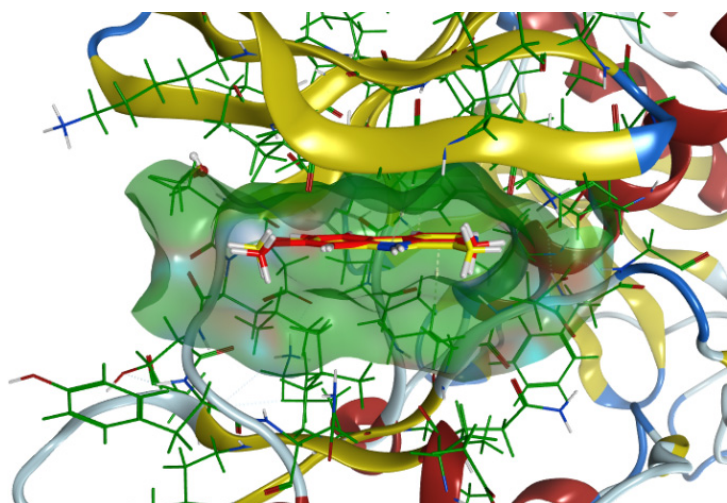


Abbildung 79: Docking von Harmin **25** in die Röntgenkristallstruktur des Harmin **25**/DYRK1A-Komplexes. Grün – Kohlenstoffatome des Proteins, gelb – natürliches Harmin **25** aus PDB-Daten, rot – Konformation 1 der Dockingergebnisse.

Auch die DSX-Werte der ersten beiden Konformationen spiegeln die ähnliche Ausrichtung zur ursprünglichen Orientierung wieder. Dadurch wird deutlich, dass der DSX-Score sehr gut zum Identifizieren der natürlichen Konformation geeignet ist. Wie bereits beschrieben zeigt die Ermittlung der London dG-Werte, dass die beiden besten Konformationen, zwar mit unter den zehn Besten waren, aber nur am dritt- und viert-besten berechnet wurden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die verwendete Docking-Methode für die Simulation von Harmin **25** geeignet ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch bei Austausch des Harmins **25** gegen ähnliche Liganden, die ebenfalls auf einem β -Carbolingrundgerüst basieren, naturnahe Interaktionen und Orientierungen kalkuliert werden können.

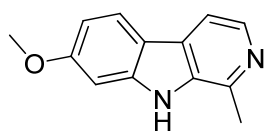
3.2.2. Synthese von DYRK1A-Inhibitoren

Einleitung und Motivation

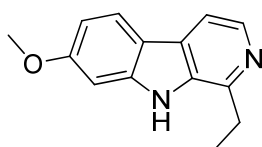
Basierend auf dem vorher entwickelten Pharmakophormodell sollte dieses nun experimentell evaluiert werden. Durch entsprechende Derivatisierungen von Harmin **25** sollten die identifizierten Merkmale bestätigt werden und die Grenzen des Modells aufgezeigt werden.

Zusätzlich dazu sollten Derivate entwickelt werden, die nicht nur DYRK1A inhibieren, sondern auch eine bessere Selektivität in Bezug auf MAO-A aufweisen. Die Leitstruktur Harmin **25** ist zwar der momentan potenteste oral bioverfügbare DYRK1A-Inhibitor, wird aber aufgrund von Nebeneffekten wahrscheinlich niemals als Therapeutikum eingesetzt werden können. Die dabei kritischste Nebenwirkung basiert auf der Koinhibition von MAO-A, so dass neue Inhibitoren dieses aussparen sollten. Auf die Inhibition von MAO-A wird im Anschluss an die biologische Evaluation der neuen Derivate gegenüber DYRK1A eingegangen.

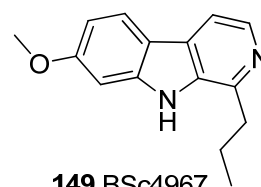
In Vorarbeiten von A. Nazari wurden β -Carbolinderivate dargestellt, die die Notwendigkeit und Grenzen der Features F3 und teilweise F4 evaluieren sollten (Abbildung 80).



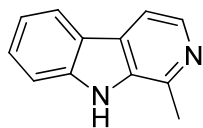
25 Harmin (BSc4968)



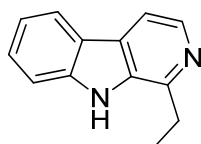
148 BSc4966



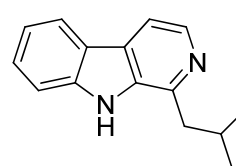
149 BSc4967



150 Harman (BSc4961)



151 BSc4962



152 BSc4964

Abbildung 80: Strukturformeln der Leitstruktur Harmin **25** (BSc4968) und der parallel von A. Nazari dargestellten Derivate **148** (BSc4966), **149** (BSc4967), **150** (BSc4961), **151** (BSc4962) und **152** (BSc4964) zur Evaluation von Feature F3 und F4.

Da das Pharmakophormodell eine hydrophobe Gruppe in der Position der Methylgruppe am Pyridinring fordert, wurde dieses Methyl in **25** zu Ethylgruppe in **148** und Iso-Propylgruppe in **149** bzw. Iso-Butylgruppe in **152** verlängert. Die biologischen Ergebnisse der Derivate **148-152** zeigten, dass eine Verlängerung zwar möglich ist, die Aktivität gegenüber DYRK1A aber verschlechtert wird. Wird die Methoxyfunktion, die dem Merkmal von Feature F4 entspricht, wie in **150-152** weggelassen so nimmt die DYRK1A-Inhibition deutlich ab.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Grenze des Features F4 ermittelt werden. Dafür sollten die Derivate BSc5073 **153** mit einer Ethoxyeinheit und BSc5071 **154** mit einer Heptyloxyeinheit dargestellt werden. Da PEG-Substituenten in der medizinischen Chemie häufig eingesetzt werden, um die Löslichkeit zu erhöhen (siehe Kapitel 3.1.3), sollten auch die Derivate BSc5041 **155** und BSc5042 **156** synthetisiert werden.^{254, 277}

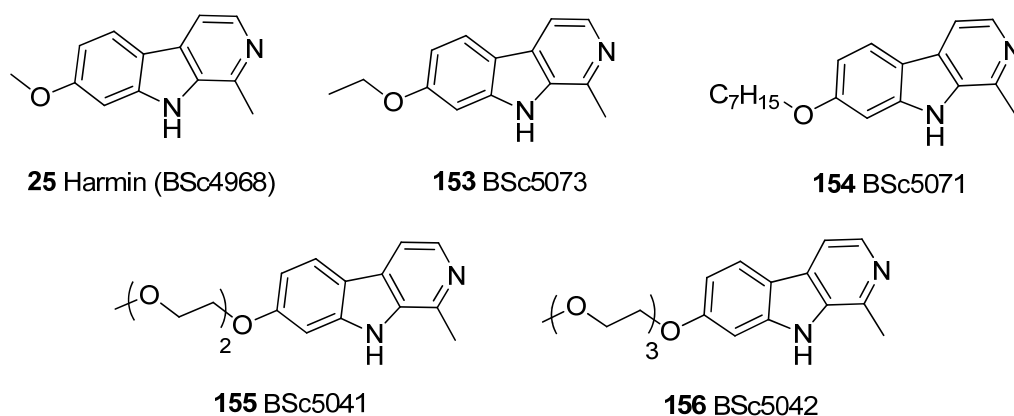


Abbildung 81: Strukturformeln der Leitstruktur Harmin **25** (BSc4968) und der geplanten Derivate **153** (BSc5073), **154** (BSc5071), **155** (BSc5041) und **156** (BSc5042) zur Evaluation von F4.

Die Erprobung der fünf Substanzen im Pharmakophormodell ergab, dass alle als aktiv eingestuft werden und zusätzlich gute RMSD-Werte aufweisen. In Abbildung 82 ist links (A) das Docking von **155** in der ATP-Bindungstasche von DYRK1A gezeigt. Hier ist gut zu erkennen, dass die PEG-Seitenkette aus der Tasche in Richtung der Lösungsmittel-exponierten Öffnung zeigt. Somit sollte diese Seitenkette keinen negativen Einfluss auf die Aktivität als DYRK1A-Inhibitor aufweisen. Auf der rechten Seite (B) der Abbildung 82 ist die Anpassung von **155** ins Pharmakophormodell gezeigt. Das β -Carbolingrundgerüst ist ähnlich wie Harmin **25** orientiert, wodurch F1-F3 und F5 ausgefüllt werden. Der PEG-Substituent wird in Richtung des Feature F4 gefaltet, so dass auch dieses Merkmal des Pharmakophormodells erfüllt wird.

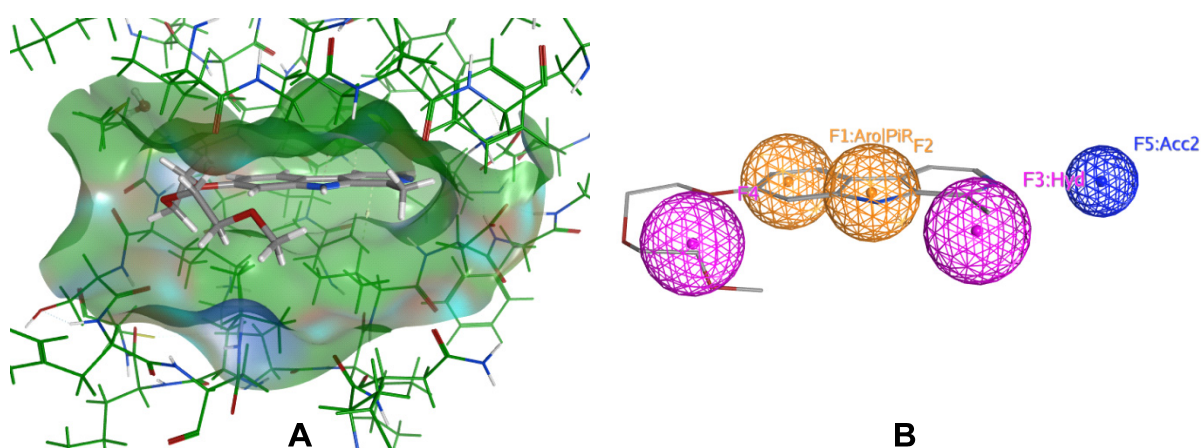


Abbildung 82: **A** Durch Protein/Liganden-Docking berechneter Bindungsmodus von **155** mit DYRK1A. **B** Anpassung von **155** ins Pharmakophormodell.

Da im Docking von Harmin **25** in DYRK1A erkennbar war, dass die N-H-Position des β -Carbolins zur Öffnung der aktiven Tasche orientiert ist, sollte eine Substitution dieser Position keinen Einfluss auf die Aktivität gegenüber DYRK1A im Vergleich zu der Leitstruktur Harmin **25** ausüben. Zusätzlich wurde die Position im Pharmakophormodell nicht durch ein bestimmtes Merkmal gekennzeichnet, weshalb ihr Charakter zumindest in Bezug auf das Pharmakophormodell ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität haben sollte. Diese Annahme sollte anhand des *N*-Heptylderivats BSc5072 **157** ggf. bestätigt werden. Der Austausch von Harmin **25** zu *N*-Heptylharmin **157** führt wie erwartet im Docking dazu, dass die Alkylseitenkette aus der ATP-Tasche in Richtung der Lösungsmittel-zugewandten Öffnung zeigt (Abbildung 83). Es wird keine sterische Hinderung erwartet. Desweiteren wurde erwartet, dass diese Derivatisierung zu einer Erhöhung der Selektivität gegenüber MAO-A führen würde (siehe Kapitel 3.2.4).

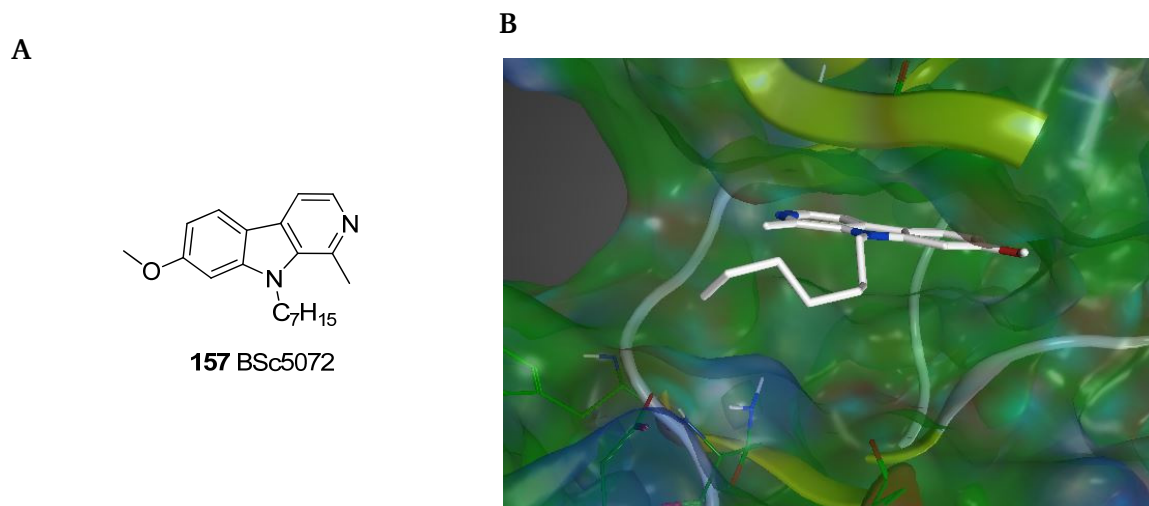
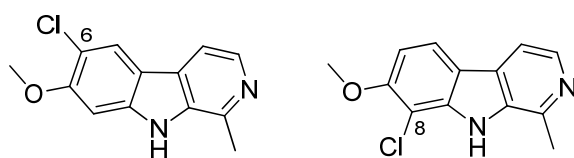


Abbildung 83: **A** Strukturformel des *N*-Heptylharmin **157** (BSc5072), **B** Docking von *N*-Heptylharmin **157** in DYRK1A. Weiß: Kohlenstoffatome, blau: Stickstoffatome, rot: Sauerstoffatom.

Zwei Derivate mit Chloratomen in Position sechs BSc5049 **158** und acht BSc5048 **159** von Harmin **25** wurden geplant (Abbildung 84). Beide Positionen sind zum einen ähnlich der N-H Position nicht durch das Pharmakophormodell definiert. Zum anderen sollte die Substitution die Aktivität gegenüber MAO-A negativ beeinflussen und dadurch die Selektivität als DYRK1A-Inhibitor erhöhen. Diese Hypothese wird in Kapitel 3.2.4 näher beschrieben.



158 BSc5049

159 BSc5048

Abbildung 84: Strukturformeln der geplanten chlorierten Harminderivate **158** (BSc5049) und **159** (BSc5048).

Beide Chlorderivate **158** und **159** wurden des Weiteren im Docking evaluiert. Dabei wurde für 6-Chlorharmin **158** eine zusätzliche Interaktion mit Glutamin 239 (Glu239) vorhergesagt (Abbildung 85). Ergänzend ergab die Kalkulation von **158** und **159** im Pharmakophormodell, dass nur das 6-Chlorderivat **158** DYRK1A inhibieren sollte.

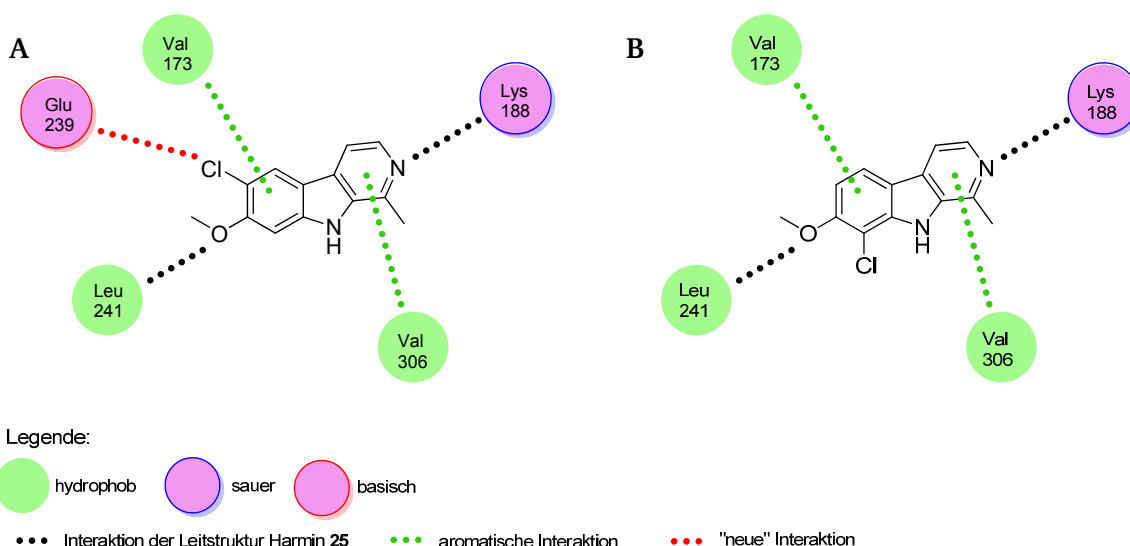
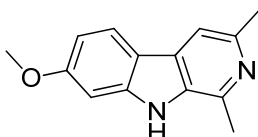


Abbildung 85: Protein/Liganden-Docking von **A** 6-Chlorharmin **158** mit zusätzlicher Interaktion zu Glu239 im Vergleich zu **B** 8-Chlorharmin **159**.

Darüber hinaus wurde ein Derivat **160** geplant, das eine zusätzliche Methylfunktion aufweist (Abbildung 86). Die Position ist ebenfalls wie bei den Chlorderivaten **158** und **159** nicht vom Pharmakophormodell vorgegeben.



160

Abbildung 86: Strukturformel des Dimethylharminderivats **160**.

Laut Berechnung des Modells kann eine Aktivität des Derivats **160** gegenüber DYRK1A erwartet werden. Aus subjektiver Betrachtung des Dockings wäre eine geringe Drehung des Grundgerüsts aufgrund einer sterischen Hinderung, ausgelöst durch die Methylgruppe, denkbar.

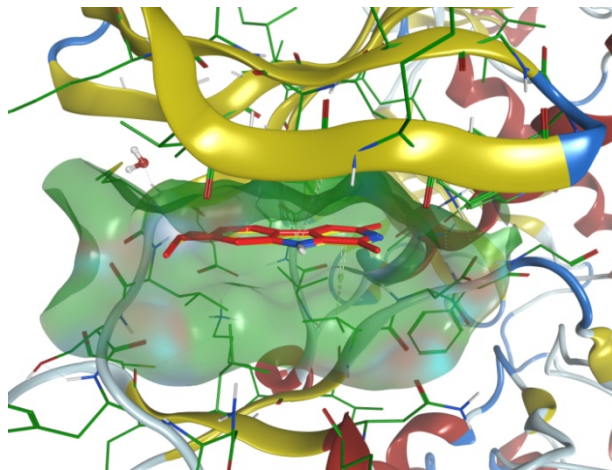


Abbildung 87: Docking des Dimethylharminderivats **160**. Grün – Kohlenstoffatome des Proteins, gelb – natürliches Harmin **25** aus PDB-Daten, rot – beste Konformation von **160** des Dockings.

Dennoch entspricht der im Docking berechnete *Score* (London dG = -9,2889) für **160** nahezu dem von Harmin **25** (London dG = -9,3105) (Abbildung 87). Zusätzlich wird durch Einführung der Methylgruppe eine potentielle sterische Hinderung in der Bindung zu MAO-A erwartet, wodurch die Selektivität gegenüber DYRK1A verbessert werden würde.

Synthese der Harminderivate 153-156

Die Darstellung der an der Methoxyposition verlängerten Derivate **153-156** sollte ausgehend von dem kommerziell erhältlichen β -Carbolin Harmol **28** erfolgen, welches eine freie Hydroxyfunktion an dieser Position aufweist (Abbildung 88).

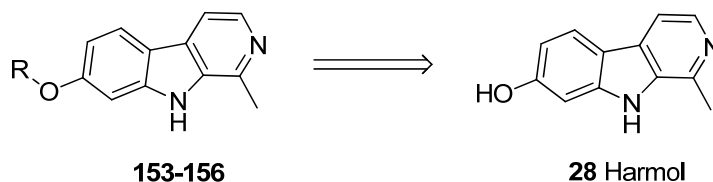


Abbildung 88: Retrosynthetischer Ansatz für die Synthese der O-substituierten Derivate **153-156**.

Die Alkylierung bzw. Pegylierung des Phenols von Harmol **28** wurde unter Verwendung des jeweiligen Alkohols: Ethanol, 2-(2-Methoxyethoxy)ethanol **161a** oder

2-(2-(2-Methoxyethoxy)-ethoxy)ethanol **161b** durchgeführt, die vorher mit Toluolsulfonsäurechlorid **116** aktiviert wurden.²⁷⁸⁻²⁸⁰ Dies war notwendig, da die Hydroxygruppe als Abgangsgruppe ungeeignet und damit keine Reaktion zum Produkt möglich gewesen wäre. Die Umsetzung zum Tosylat **162a/b** wurde, wie in den vorherigen Synthesen, mit Natriumhydroxid als Base in einer Lösungsmittelmischung aus THF und Wasser in guten Ausbeuten durchgeführt. Im Falle des Heptyloxyderivats **154** wurde Heptyliodid als Alkylierungsreagenz eingesetzt, welches bereits Iodid als gute Abgangsgruppe aufweist.

Harmol **28** wurde mit Caesiumcarbonat als Base unter Argonatmosphäre und bei 0 °C DMF voraktiviert, bevor das Alkylierungs-/Pegylierungsreagenz zugegeben wurde. Obwohl sowohl die Hydroxyfunktion als auch das Amin deprotoniert und damit auch in die Substitution an Alkyl/PEG eingreifen können, wird hauptsächlich das O-alkylierte/pegylierte Produkt gebildet. So konnte z. B. das Ethoxyderivat **153** nach automatisierter säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 72 % isoliert werden (Abbildung 89).

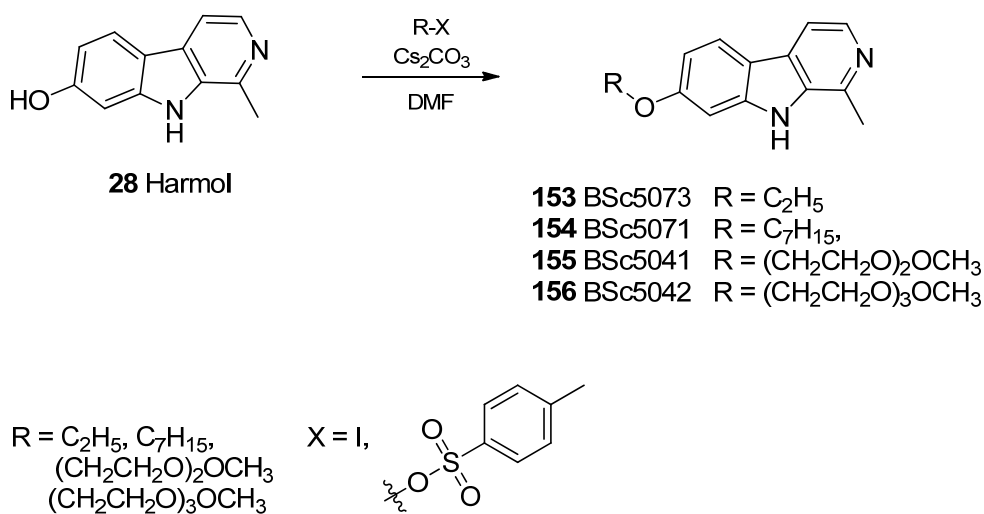


Abbildung 89: Synthese der in der Methoxyposition verlängerten Derivate **153-156**.

Synthese von *N*-Heptylharmin **157**

Die Alkylierung an N-H zum *N*-Heptylharmin **157** wurde analog der von Carprofen **20** und Carbazol **23** durchgeführt. Dafür wurde Natriumhydrid im Überschuss und Harmin **25** unter Argonatmosphäre in abs. DMF suspendiert. Dadurch wird das Stickstoffatom deprotoniert, um es für die folgende nukleophile Substitution an Heptyliodid vorzuaktivieren. Nach

Aufarbeitung wurde das alkylierte β -Carbolinderivat **157** in einer hohen Ausbeute von 95 % erhalten (Abbildung 90).

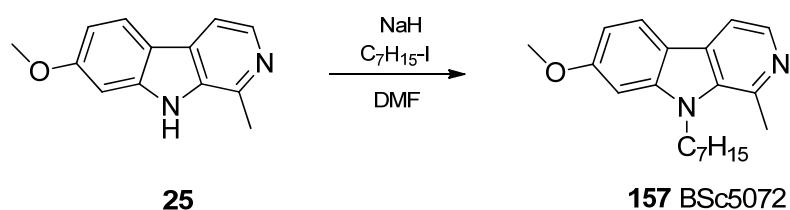


Abbildung 90: Synthese von *N*-Heptylharmin **157**.

Synthese der Chlorderivate **158** und **159**

Die Darstellung der beiden Chlorderivate **158** und **159** wurde analog einer von Ponce *et al.* beschriebenen Synthese durchgeführt (Abbildung 91).²⁸¹ Hierbei wurde *N*-Chlorsuccinimid (NCS) als Chlorquelle benutzt, da Chlorgas deutlich aufwendiger handzuhaben ist, korrosiv wirkt und dazu schwer zu dosieren ist. Wird ein Überschuss an Chlor eingesetzt kann es zu zahlreichen Nebenprodukten durch Mehrfach-Chlorierung kommen. Als Edukt wurde Harmin **25** benutzt, das in Ethylacetat gelöst wurde. Das NCS wurde in Dichlormethan (DCM) gelöst, bevor es zu der Harmin **25**-Lösung gegeben wurde. Dabei wurde auf vollständigen Lichtausschluss geachtet. Dieses ist notwendig um eine Licht-induzierte radikalische Substitutionsreaktion an der Seitenkette, in diesem Fall der Methylgruppe am Pyridinring und der Methoxyfunktion, zu verhindern. Die Reaktion wurde bei 55 °C für 12 h gerührt. Bei dem Reaktionstyp handelt es sich um eine elektrophile aromatische Substitution, die durch den positiven mesomeren Effekt der Substituenten Methoxy und Amin in die Positionen *ortho* und *para* dirigiert wird. Dadurch erfolgt die Chlorierung selektiv an der sechsten und achten Position von Harmin **25**. Zusätzlich wird auch ein geringerer Anteil des dichlorierten Derivats **163** gebildet. Durch säulenchromatographische Aufarbeitung konnten die beiden Derivate **158** und **159** separiert werden und mittels NMR-Spektroskopie wurde die Position der Substitution der entsprechenden Probe zugeordnet.

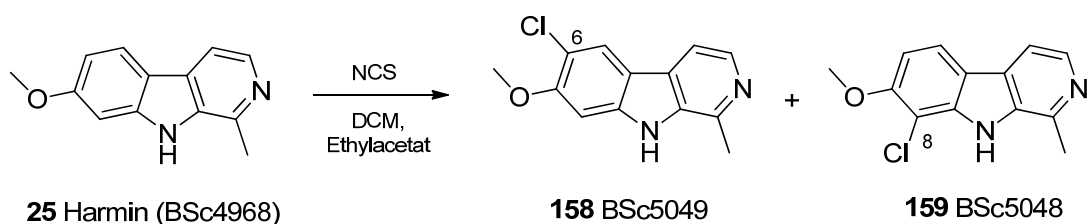


Abbildung 91: Synthese der chlorierten Harminderivate **158** und **159**.

Synthese des Dimethylderivats 160

Die Darstellung des Dimethylharminderivats **160** sollte in Anlehnung an eine Synthese von Padwa *et al.* erfolgen.²⁸² In der Veröffentlichung wurde ein Methylharmanderivat **164** aus 2-Iodanilin erstellt, wobei lediglich auf die Methoxyfunktion verzichtet wurde. Dabei sollte das β -Carbolin **160** aus dem Oxazol **165** durch eine Stille-Kupplung aufgebaut werden. Hierbei wurde beschrieben, dass das nach Kupplung erhaltene Intermediat **166** *in situ* durch Kondensation das β -Carbolingrundgerüst mit entsprechenden Substituenten bilden würde. Das Oxazol **165** sollte aus dem Acetyl-geschützten Vorläufer **167** in einer Kondensationsreaktion zyklisiert werden. Eine Umschüttung des *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten Amin **168** zu **167** war notwendig, da beschrieben wurde, dass die vorherige Peptidkupplung von 2-Iod-5-methoxyanilin **169** mit *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-alanin **170** zu **168** mit einer alternativen Acetylschutzgruppe zu sehr geringen Ausbeuten führte. Das 5-Methoxyanilin **169** sollte aus Kostengründen in zwei Stufen aus 4-Methoxy-2-nitroanilin **171** dargestellt werden, obwohl es kommerziell erhältlich ist (Abbildung 92).

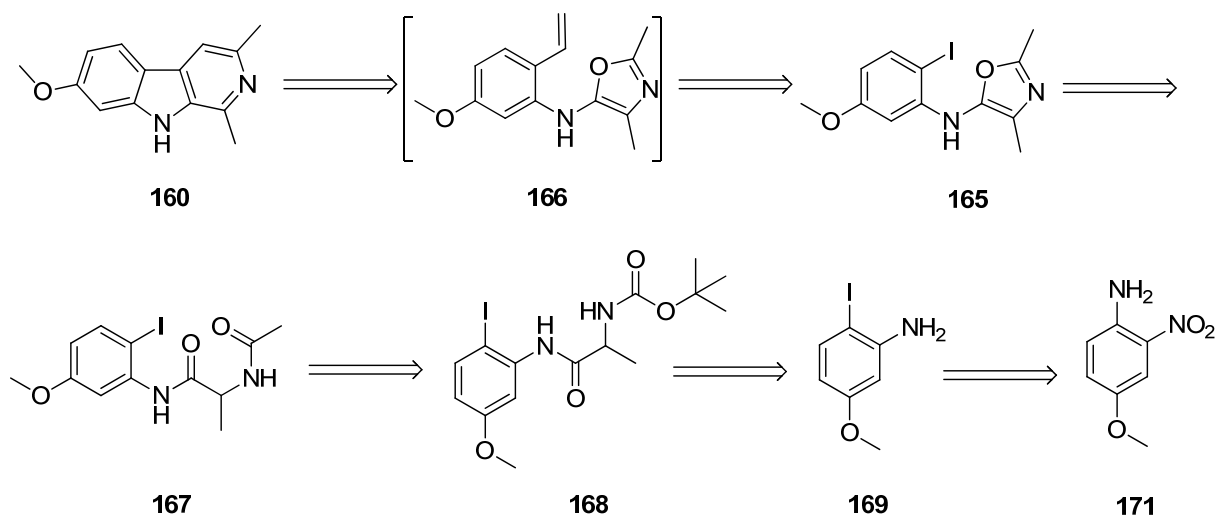


Abbildung 92: Retrosynthetischer Ansatz zur Darstellung von Methylharmine **160**.

Parallel zur Synthese des Dimethylharminderivats **160** sollte zuerst die publizierte Anleitung auf Reproduktionsfähigkeit überprüft werden.

Hierfür wurde 2-Iodanilin **172** mit *N-tert*-Butyloxycarbonyl-L-alanin **170** unter Peptidkupplungsbedingungen zum Zwischenprodukt **173** umgesetzt. Zuerst wurde auf die beschriebenen Reagenzien, *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), zurückgegriffen. Allerdings konnte bei diesen Bedingungen

lediglich eine Ausbeute von 28 % erzielt werden. Ein als mögliche Alternative durchgeführter Ansatz, mit im Arbeitskreis bewährten Peptidkuppplungsbedingungen: PyBOP und Triethylamin in DMF, führte zu keiner Steigerung der Ausbeute. Da es sich um die erste Stufe in dieser Synthese handelt, wurde an dieser Stelle auf eine Optimierung der Ausbeute verzichtet. Im Anschluss an den Aufbau des Peptids **173** wurde in zwei aufeinander folgenden Stufen zuerst die *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten. Nach vollständigem Entfernen aller flüchtigen Komponenten im Vakuum wurde dann mit Hilfe von Essigsäureanhydrid in Pyridin und THF die Aminfunktion mit einer Acetylschutzgruppe geschützt. Dies lieferte das Acetyl-geschützte Zwischenprodukt **174** in einer Ausbeute von 82 % über zwei Stufen. Die folgende Umsetzung zum Oxazol **175** wurde in Anwesenheit von TFA und TFA-Anhydrid durchgeführt. Hierbei wurde in mehreren Ansätzen ein vollständiger Umsatz des Eduktes zu einem neuen UV-aktiven Produkt beobachtet. Doch konnte das Oxazol **175** nach Aufarbeitung nicht erhalten werden. Der Grund ist vermutlich, dass eine Zersetzung bzw. Rückreaktion während der Extraktion stattfindet, die durch die wässrigen Bedingungen hervorgerufen wird. Auch bei genauer Beobachtung des pH-Wertes gelang die Isolation nicht. Testansätze, in denen die Reaktionsmischung im Vakuum getrocknet und direkt ohne weitere Reinigung in der Stille-Kupplung der letzten Stufe eingesetzt wurde, führten zu zahlreichen neuen UV-aktiven Substanzen. Keine dieser Substanzen konnte eindeutig dem Harmanderivat **176** zugeordnet und isoliert werden. Andere Reaktionsbedingungen für die Ringbildung zum Oxazol **175**, wie z. B. die Kombination aus Triphenylphosphin, Iod, Triethylamin oder der Einsatz von Phosphorylchlorid führten ebenfalls zu keinem isolierten Produkt **175** (Abbildung 93).

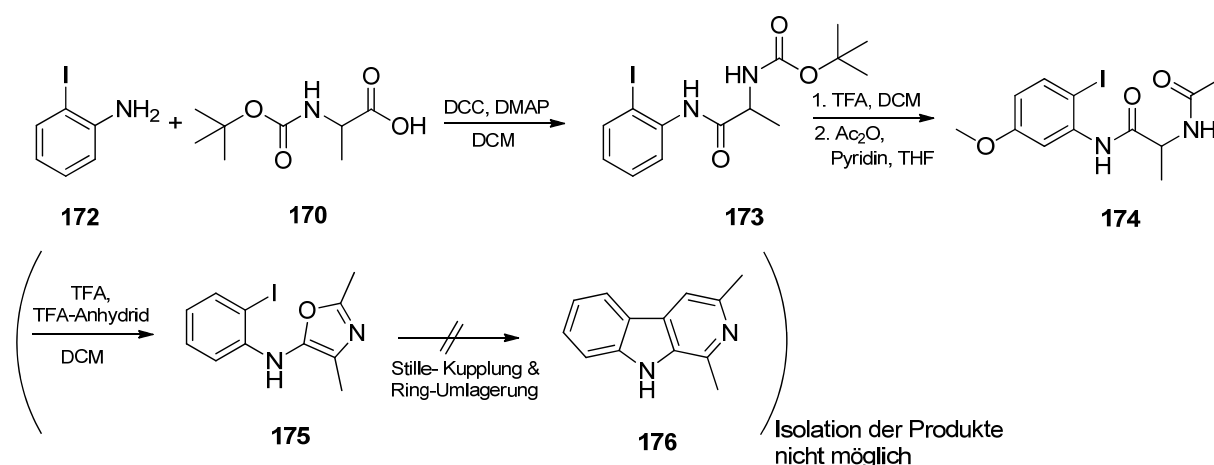
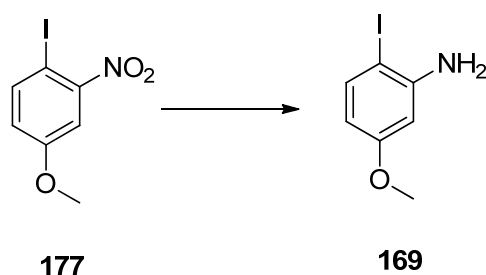


Abbildung 93: Synthese des Derivats **176** nach Padwa *et al.*²⁸²

Das für die Synthese des Dimethylharminderivats **160** notwendige Edukt 2-Iod-5-methoxyanilin **169** sollte *via* Sandmeyer-Reaktion mit anschließender Reduktion der Nitrofunktion zum Amin dargestellt werden (Abbildung 94). In der ersten Stufe wurde 4-Methoxy-2-nitroanilin **171** in halbkonzentrierter Salzsäure gelöst und unter Kühlung Natriumnitrit zugegeben, wobei ein Aryldiazoniumsalz als Intermediat gebildet wird. Durch Zugabe von Kaliumiodid, wird dann das Diazoniumsalz gegen Iodid ausgetauscht. Dabei handelt es sich um eine radikalische Kettenreaktion, in der ein Iod-Radikal als Kettenträger dient. Das iodierte Nitroanisole **177** wurde nach Extraktion in ausreichender Reinheit und hoher Ausbeute erhalten.²⁸³ In der zweiten Stufe wurde die Nitrofunktion reduziert. Hierfür wurden verschiedene Reaktionsbedingungen für die Reduktion einer Nitrofunktion evaluiert (Tabelle 12). Dabei konnte nur bei Ansatz 6 unter Verwendung von elementarem Eisen und Eisen(III)chlorid in Ethanol und Essigsäure eine Ausbeute von 70 % erhalten werden.²⁸⁴ Bei den meisten anderen Reaktionsansätzen wurde keinerlei Umsatz des Eduktes beobachtet.

Tabelle 12: Evaluation der Reduktionsbedingungen der Nitrofunktion von **177**.



Ansatz	Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur	Reaktionszeit	Ergebnis
1	Pd/C, H ₂	MeOH	Raumtemperatur	über Nacht	5 % Umsatz
2	Sn	HCl/H ₂ O = 1:1	Rückfluss	über Nacht	Kein Umsatz
3	SnCl ₂	Ethylacetat	Rückfluss	über Nacht	Kein Umsatz
4	N ₂ H ₄ ·H ₂ O, C	Ethanol	80 °C	über Nacht	Kein Umsatz
5 ²⁸³	N ₂ H ₄ ·H ₂ O, C, FeCl ₃	Methanol	Rückfluss	über Nacht	Kein Umsatz
6 ²⁸⁴	Fe, FeCl ₃	Essigsäure, Ethanol	80 °C	2,5 h	70 % Ausbeute

Die anschließende Peptidkupplung zu **168** wurde analog zu der vorher beschriebenen Synthese von **173** durchgeführt.

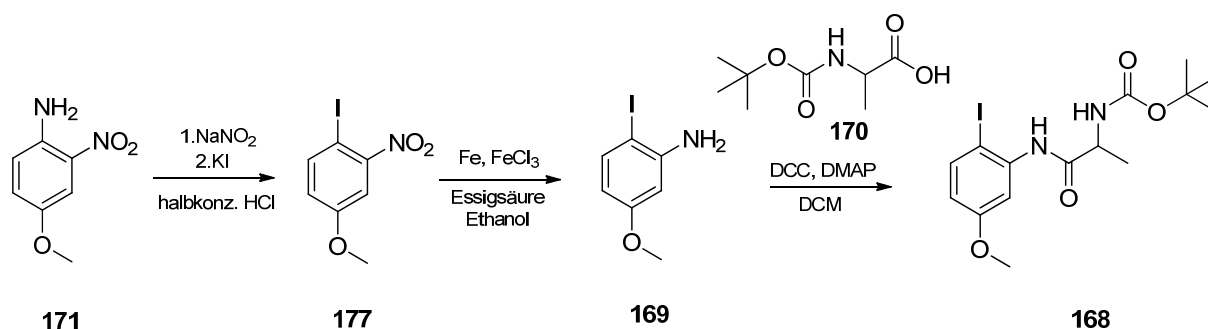


Abbildung 94: Synthese des Zwischenproduktes **168**.

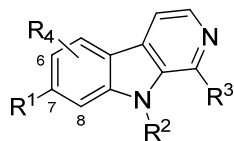
An dieser Stelle wurde die Synthese aufgrund von Zeitgründen nicht weiter fortgesetzt.

3.2.3. Biologische Evaluation der DYRK1A-Inhibitoren

Die Aktivität der synthetisierten DYRK1A-Inhibitoren wurde von der Firma Cerep bestimmt. Das Assay wird ausführlich in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die prozentuale Inhibition der getesteten Substanz relativ zur Negativkontrolle (%-Inhibition = $100 - [(gemessene \text{ Aktivität der Substanz} / \text{Aktivität der Kontrolle}) \cdot 100]$). Als Assay-interne Referenz wurde Staurosporin **30** ($IC_{50}(\text{DYRK1A}) = 19\text{-}25 \text{ nM}$)^{117, 285} verwendet. Die synthetisierten Derivate wurden mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ evaluiert.

In Tabelle 13 sind die synthetisierten β -Carbolinderivate und ihre %-Inhibitionswerte zusammengefasst. Zusätzlich sind die im Pharmakophormodell ermittelten RMSD-Werte aufgeführt. Sie geben die Abweichung der Summe aus den einzelnen Charakteristika zu den Mittelpunkten der Merkmale des Pharmakophormodells pro Liganden an.

Tabelle 13: Bestimmung der Aktivität der synthetisierten β -Carbolinderivate gegenüber DYRK1A.



β -Carboline	BSc-Nummer	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	RMSD ^a	%-Inhibition bei 10 μ M ^b
25	4965 (Harmin)	OMe	H	Me	H	0.4791	97.3 \pm 1.1
153	5073	OEt	H	Me	H	0.7349	92.4 \pm 0.6
154	5071	OHep	H	Me	H	0.5107	84.2 \pm 0.4
155	5041	(OCH ₂ CH ₂) ₂ OMe	H	Me	H	0.5252	90.9 \pm 1.1
156	5042	(OCH ₂ CH ₂) ₃ OMe	H	Me	H	0.5694	88.9 \pm 1.1
157	5072	OMe	Hep	Me	H	0.4963	97.6 \pm 1.7
158	5049	OMe	H	Me	6-Cl	0.4660	95.0 \pm 1.1
159	5048	OMe	H	Me	8-Cl	N/A	91.2 \pm 0.2

^a Wurzel der mittleren quadratischen Entfernung (*Root of the mean square distances*) der Substanzmerkmale zu den Features des Pharmakophormodells in Å. Substanzen, die nicht vom Pharmakophormodell akzeptiert wurden sind mit N/A gekennzeichnet. ^b Die Ergebnisse sind angegeben als %-Inhibition zur Kontroll-spezifischen Aktivität = 100-[(gemessene Aktivität der Substanz/Aktivität der Kontrolle)*100] bei einer Konzentration von 10 μ M der Testsubstanz. Als Referenz wurde Staurosporin **30** verwendet.

Zusätzlich zu den neuen Derivaten wurde der bekannte DYRK1A-Inhibitor Harmin **25** (IC₅₀(DYRK1A) = 33-700 nM)^{107, 115} ebenfalls im Assay evaluiert, um einen direkten Vergleich der Derivate mit der Leitstruktur **25** zu ermöglichen. Harmin **25** weist hier eine Aktivität von 97.3 % zur Kontrolle auf. Dieser Trend wurde basierend auf den bekannten Werten der mittleren Inhibitionskonzentration erwartet. Der RMSD-Wert von 0.4791 Å zeigt, dass die funktionellen Gruppen von Harmin **25** nahe den Mittelpunkten der Merkmale des Pharmakophormodells angeordnet sind.

Die Verlängerung der Methoxy- zu einer Ethoxyfunktion in Derivat **153** verursacht eine leichte Reduktion der Aktivität auf 92.4 %. Wird diese Position weiter verlängert zu einer Heptyloxykette in **154** so sinkt die Aktivität weiter auf 84.2 %. In den DYRK1A-Inhibitoren

155 und **156** wurden die unpolaren Alkylseitenfunktionen durch die Löslichkeitsverbessernden PEG-Ketten ausgetauscht. In **155** wurde eine Diethylenglykol-Einheit eingeführt, welche dieselbe Länge aufweist, wie die Heptylkette in **154**. Dadurch wurde ein Anstieg der Aktivität auf 90.9 % erzielt. Eine weitere Verlängerung zum tripegylierten **156** vermindert die Aktivität in sehr geringem Maße auf 88.9 %. Obwohl eine Verlängerung der Methoxy-Seitenkette die Aktivität gegenüber Harmin **25** nicht steigert, sind alle vier Derivate **153-156** potente DYRK1A-Inhibitoren. Die Position des Feature F4 erscheint relativ variabel, wie es auch bereits im Protein/Liganden-Docking vorhergesagt werden konnte (siehe Abbildung 82). Das *N*-Heptylderivat **157** wurde dargestellt, da diese Position nicht vom Pharmakophormodell vorgegeben wird. Zusätzlich zeigte das Docking des Liganden **157** in die aktive Tasche von DYRK1A, dass aufgrund der Orientierung keine sterische Hinderung, die die Aktivität negativ beeinflussen könnte, erwartet wird (siehe Abbildung 83). Diese Annahme konnte experimentell bestätigt werden: So inhibiert **157** DYRK1A (%-Inhibition = 97.6) leicht besser als die Leitstruktur **25**.

Die Derivate **153-157** wurden in den vorherigen Berechnungen auf Basis des Pharmakophormodells als aktiv eingestuft. Die experimentelle Evaluation konnte somit die Eignung des Modells zur Vorhersage inhibitorisch aktiver β -Carboline bestätigen.

Die beiden Chlorderivate **158** und **159** wurden entworfen, um den Einfluss der Elektronendichte auf den Ring zu untersuchen. Ergänzend wurden die beiden Positionen, wie beim *N*-Heptylderivat **157**, nicht durch das Pharmakophormodell vorgegeben. Die Berechnung der beiden Substanzen ergab, dass nur das 6-Chlorderivat **158** vom Pharmakophormodell als aktiv eingestuft wird. Ein Wert von 95.0 % bestätigte die vorherige computerbasierte Analyse. Allerdings wurde das 8-Chlorderivat **159**, entgegen den experimentellen Ergebnissen, als inaktiv eingestuft. **159** inhibiert DYRK1A mit 91.2 % im Vergleich zur Referenz. Es handelt sich dabei um eine fälschlicherweise negativ (*false negative*) ermittelte Vorhersage. Dennoch konnte der Trend in der Aktivität der beiden Chlorharmin **158** und **159** bereits anhand des Protein/Liganden-Dockings prognostiziert werden. Hierbei wurde eine zusätzliche Interaktion von 6-Chlorharmin **158** mit Glu239 vorausgesagt, die bei 8-Chlorharmin **159** nicht erwartet wird (siehe Abbildung 85).

Insgesamt inhibieren alle synthetisierten β -Carbolinderivate DYRK1A ähnlich potent, wie die Leitstruktur Harmin **25**. Zusätzlich konnten die vorher erstellten computerbasierten Methoden hiermit experimentell evaluiert und bestätigt werden.

Im folgenden Kapitel wird die Untersuchung der aktiven Substanzen hinsichtlich ihrer Selektivität erörtert.

3.2.4. Untersuchung der DYRK1A-Inhibitoren hinsichtlich der Selektivität

Einleitung und Motivation

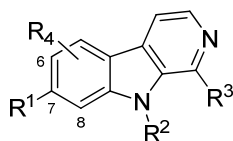
Eins der größten Probleme in Bezug auf die klinische Anwendbarkeit von Harmin **25** als DYRK1A-Inhibitor ist die Koinhibition von MAO-A, wodurch es zu nicht tolerierbaren Nebeneffekten kommt. MAO-A reguliert unter anderem die Konzentration von Serotonin und Noradrenalin im zentralen Nervensystem. Bei Hemmung des Enzyms oder genetischer Mutation, z. B. im Brunner-Syndrom, kommt es zu ausgeprägtem aggressiven Verhalten und mentaler Retardierung.^{142, 143} Basierend auf dieser Beobachtung sollten neu-identifizierte DYRK1A-Inhibitoren möglichst selektiv sein und MAO-A nicht inhibieren.

Es wurde bereits publiziert, dass das verwandte MAO-B von Harmin **25** und weiteren β -Carbolinderivaten kaum inhibiert wird. So wurde für Harmin **25** eine Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (K_i) von 16.9 nM in Bezug auf MAO-A und ein Wert von $K_i = 120.8 \mu\text{M}$ in Bezug auf die Bindung zu MAO-B gemessen. Daher wurde im Folgenden nur die Aktivität der synthetisierten Derivate gegenüber MAO-A untersucht. Hierbei sollten die neuen potenten DYRK1A-Inhibitoren MAO-A signifikant weniger inhibieren und somit keine der oben dargestellten Nebeneffekte aufweisen.

Struktur-basiertes Docking von β -Carbolinen in die aktive-Tasche von MAO-A

Da von MAO-A ebenfalls Daten aus einer Röntgenkristallstrukturanalyse mit kokristallisiertem Harmin **25** (PDB: 2Z5X) verfügbar ist, wurde analog zum Struktur/Liganden-Docking des Harmin **25**/DYRK1A-Komplexes eine computerbasierte Analyse aller synthetisierten Derivate durchgeführt.²⁸⁶ Dabei soll nicht der Ligand ermittelt werden, der am besten bewertet wird, sondern derjenige, der nicht in das Enzym passt. So entsprechen die höchsten Werte des London dG-Scores, den Substanzen, die voraussichtlich MAO-A nicht inhibieren. Vor der Bewertung der Liganden durch den London dG-Score wurde die zur nativen Orientierung ähnlichste Konformation mit Hilfe der DSX-Scoring-Funktion ermittelt. Die Ergebnisse des Dockings sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Dockingergebnisse der synthetisierten DYRK1A-Inhibitoren in MAO-A.



β -Carboline	BSc-Nummer	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	London dG-Score [kcal/mol]
25	4965 (Harmin)	OMe	H	Me	H	-11.559
153	5073	OEt	H	Me	H	-11.920
154	5071	OHep	H	Me	H	-11.092
155	5041	(OCH ₂ CH ₂) ₂ OMe	H	Me	H	-13.441
156	5042	(OCH ₂ CH ₂) ₃ OMe	H	Me	H	-14.870
157	5072	OMe	Hep	Me	H	-2.779
158	5049	OMe	H	Me	6-Cl	-11.581
159	5048	OMe	H	Me	8-Cl	-11.096

Im Gegensatz zu DYRK1A, in dem Harmin **25** in einer zum Lösungsmittel weit geöffneten Tasche bindet, ist die aktive Tasche von MAO-A nahezu vollständig geschlossen. Dabei handelt es sich um eine induzierte Anpassung (*induced fit*) des Enzyms nach Bindung des Inhibitors.²⁸⁶ Zusätzlich konnte beim Protein/Liganden-Docking der an der Methoxypostition verlängerten Derivate **153-156** ein Tunnel offenbart werden, der von Leu97, Phe108 und Ala111 umgeben ist (Abbildung 95).

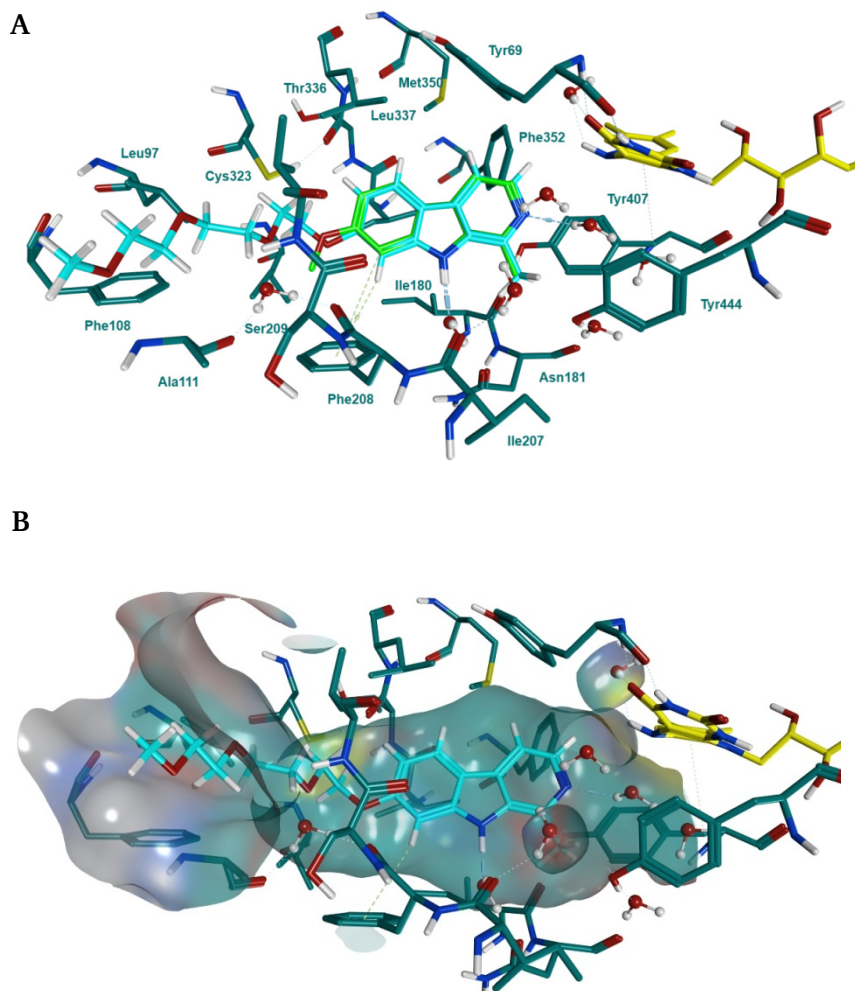


Abbildung 95: **A** Protein/Liganden-Docking von Harmin **25** (grün) in MAO-A (PDB: 2Z5X) und der berechnete Bindungsmodus vom PEG-Harminderivat **156** (türkis). In gelb ist der essentielle Ko-Faktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) dargestellt. **B** Protein/Liganden-Docking des PEG-Harminderivats **156** (türkis) in MAO-A mit Darstellung der Oberfläche der aktiven Tasche (grau).

Die Substituenten an der Methoxyposition werden im Docking in diesem Tunnel orientiert, wodurch die Aktivität gegenüber MAO-A zunehmen könnte. Dass längere Alkylketten in dieser Position die MAO-A-Aktivität steigern, wurde bereits in einer Publikation von Wouters *et al.* gezeigt.²⁸⁷

Mit Hilfe der DSX-Scoring-Funktion ist es möglich die pro Ligandenatom berechneten Potentiale als Oberfläche zu visualisieren, was eine unmittelbare Einschätzung der Dockingergebnisse ermöglicht. Dies ist für Harmin **25** als Referenz, einem der in Vorarbeiten dargestellten Propylderivate **149** sowie den drei Derivaten **157-159**, die nicht an der Methoxyposition verlängert wurden, in Abbildung 96 gezeigt.

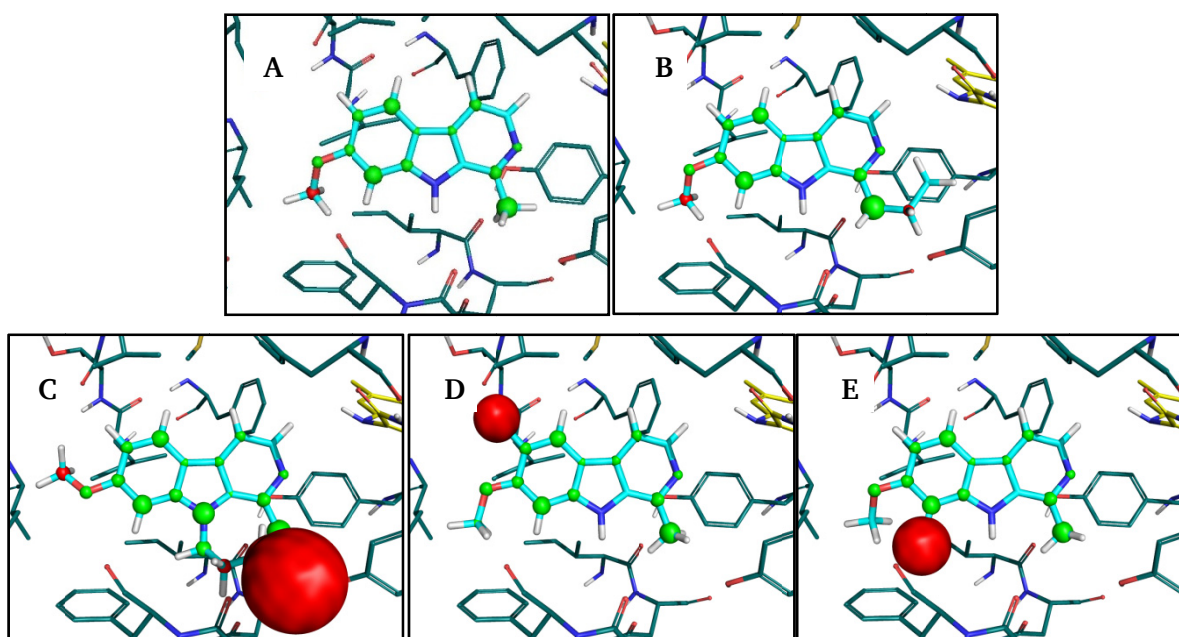


Abbildung 96: Graphische Darstellung der berechneten DSX-Potentiale je Atom der Liganden. Grün: Atome, die positiv zur Bindung beitragen, rot: Atome, die negativ zur Bindung beitragen. Die Größe der Oberflächen entspricht der Amplitude des entsprechenden Potentials. **A** Harmin **25**, **B** Propylderivat **149**, **C** *N*-Heptylharmin **157**, **D** 6-Chlorharmin **158**, **E** 8-Chlorharmin **159**.

Das *iso*-Propylderivat **149** (Abbildung 96, **B**) wurde mit in die biologische Evaluation aufgenommen, da es DYRK1A (%-Inhibition = 96.1) potent inhibiert und die Position der Propylgruppe entgegengesetzt zum Tunnel ausgerichtet ist. Somit ist eine sterische Hinderung zu erwarten, die aber nicht in der Darstellung der DSX-Potentiale visualisiert werden konnte. Wäre an dieser Position eine *iso*-Butylgruppe lokalisiert, würde das zu einer deutlichen sterischen Beeinflussung führen. Das Derivat mit der *iso*-Butylseitenkette **152**, zeigte aber kaum Aktivität gegenüber DYRK1A (%-Inhibition = 33). Für die Evaluation der Aktivität gegenüber MAO-A ist es daher nicht geeignet. Im Falle des *N*-Heptylharmin **157** (Abbildung 96, **C**) ist deutlich zu erkennen, dass die Alkylkette nur sehr schlecht in die aktive Tasche passt. Somit sollte das *N*-H-substituierte Derivat **157** kaum Aktivität gegenüber MAO-A aufweisen, was wiederum die Selektivität des DYRK1A-Inhibitors deutlich verbessern würde. Die beiden Chlorderivate **158** (Abbildung 96, **D**) und **159** (Abbildung 96, **E**) weisen ähnliche Scores wie Harmin **25** auf (Tabelle 14). Dennoch ist in der graphischen Darstellung der DSX-Potentiale deutlich erkennbar, dass das jeweilige Chloratom einen nicht geringen negativen Anteil zur Gesamtsumme beiträgt. Aufgrund der hohen Assaykosten für die Bestimmung der Aktivität gegenüber MAO-A konnte nur eines der beiden Derivate **158** und **159** evaluiert werden. Deshalb wurde das 6-Chlorharmin **156** ausgewählt, da dieses DYRK1A potenter inhibiert.

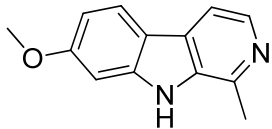
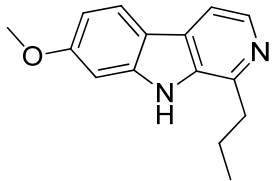
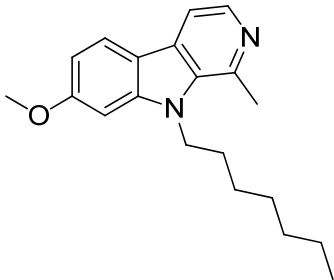
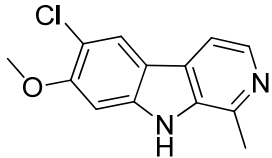
Basierend auf den Docking-Ergebnissen sollte die Leitstruktur Harmin **25** als Vergleichssubstanz, sowie die Derivate **149**, **157** und **158** im Hinblick auf ihre Selektivität gegenüber DYRK1A in einem MAO-A-Assay untersucht werden.

Biologische Evaluation der Selektivität der DYRK1A-Inhibitoren

Die Aktivität DYRK1A-Inhibitoren gegenüber MAO-A wurde von der Firma Cerep bestimmt. Das Assay wird ausführlich in Kapitel 5.1.2 beschrieben. Ebenso wie bei der Bestimmung der Aktivität gegenüber DYRK1A sind die Werte als prozentuale Inhibition der getesteten Substanz zur Aktivität der Kontrolle (%-Inhibition = $100 - [(gemessene\ Aktivität\ der\ Substanz / Aktivität\ der\ Kontrolle) * 100]$) angegeben. Als Assay-interne Referenz wurde Clorgylin **178** ($IC_{50}(MAO-A) = 37\text{ nM}$)²⁸⁸ verwendet. Die synthetisierten Derivate wurden mit einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{M}$ evaluiert. In der Tabelle 15 sind die ausgewählten β -Carbolinderivate und ihre %-Inhibitionswerte in Bezug auf MAO-A zusammengefasst.

Da bekannt ist, dass Harmin **25** das Enzym MAO-A potent inhibiert ($K_i(MAO-A) = 5\text{ nM}$), welches das größte Problem für die klinische Anwendbarkeit darstellt, wurde ein hoher Wert bei der %-Inhibition von MAO erwartet. Das Ergebnis von 103 % zeigt, dass Harmin **25** MAO-A potent inhibiert. Das *iso*-Propylderivat **149** inhibiert MAO-A lediglich zu 19 % im Vergleich zur Referenz, diese ist für die Selektivität gegenüber DYRK1A ein gutes Ergebnis. Das *N*-Heptylderivat **157**, welches ein potenter DYRK1A-Inhibitor ist, inhibiert MAO-A (%-Inhibition = 13) kaum und wäre somit ein besserer DYRK1A-Inhibitor als Harmin **25**, da MAO-A ausgespart wird. Lediglich das Chlorderivat **158** weist eine Aktivität von 80 % gegenüber MAO-A auf. Dies könnte damit erklärt werden, dass entgegen der computerbasierten Berechnung der Orientierung das Derivat leicht verdreht in der aktiven Tasche von MAO-A liegt und damit das Chloratom in den Tunnel ragt. Die kalkulierte sterische Hinderung würde somit weitestgehend verloren gehen. Die Chlorierung der Leitstruktur scheint keine favorisierbare Derivatisierung der Leitstruktur **25** in Bezug auf die Hemmung der MAO-A-Inhibition zu sein.

Tabelle 15: Bestimmung der Aktivität der β -Carbolinderivate gegenüber MAO-A.

Substanz	BSc-Nummer	Strukturformel	%-Inhibition (MAO-A) bei 1 μM^a
25 (Harmin)	BSc4965		103.4 \pm 0.0
149	BSc4967		18.5 \pm 0.0
157	BSc5072		12.7 \pm 0.4
158	BSc5049		79.9 \pm 3.3

^a %-Inhibition zur Kontroll-spezifischen-Aktivität = 100-[(gemessene Aktivität der Substanz/Aktivität der Kontrolle)*100] bei einer Konzentration von 1 μM der Testsubstanz.

Werden die ermittelten DYRK1A- und MAO-A-Inhibitionswerte von Harmin **25** und der drei auf Selektivität untersuchten β -Carbolinderivate **149**, **157** und **158** gegeneinander aufgetragen, so ist die verbesserte Selektivität von **149** und **157** deutlich erkennbar (Abbildung 97).

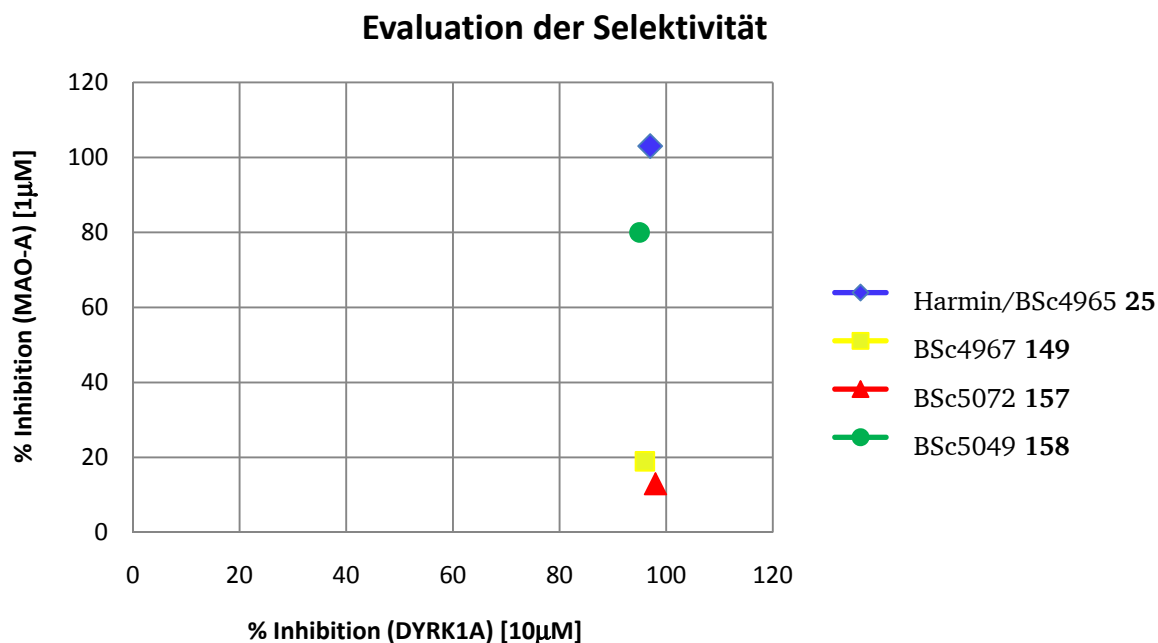


Abbildung 97: Darstellung der Selektivität anhand der Gegenüberstellung der DYRK1A- und MAO-A-Aktivitäten von Harmin **25** und den Derivaten **149**, **157** und **158**.

3.2.5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Durch Kombination eines Liganden-basierten Pharmakophormodells und eines Struktur-basierten Protein/Liganden-Dockings ist es gelungen ein computerbasiertes Modell, zur Vorhersage der Bindungsmodi und Aktivitäten von β -Carbolinderivaten als DYRK1A-Inhibitoren zu entwickeln. Das Modell konnte experimentell bestätigt werden. Dafür konnten sieben Derivate synthetisiert werden, die alle DYRK1A potent inhibieren. Zusätzlich konnten die Grenzen des Modells aufgezeigt und die Struktur-Aktivität-Beziehungen ermittelt werden (Abbildung 98).

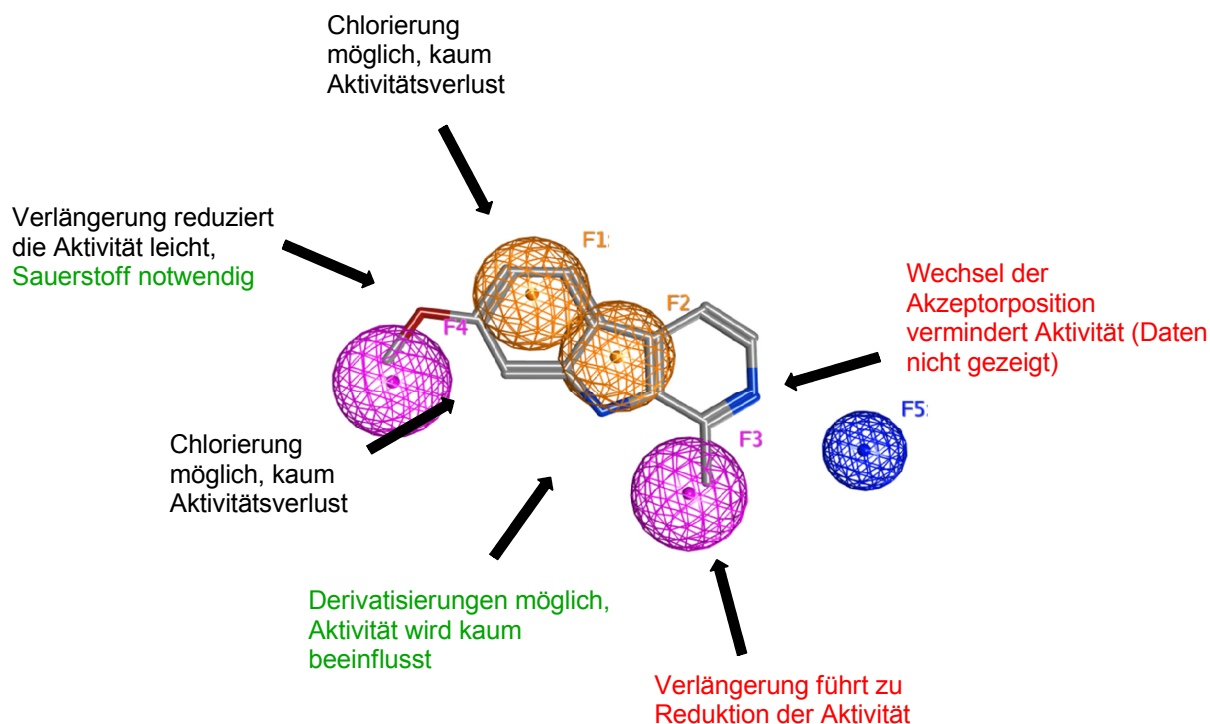
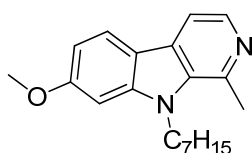


Abbildung 98: Zusammenfassung der ermittelten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Harminderivaten zu DYRK1A anhand von Harmin **25** im Pharmakophormodell.

Um eine Verbesserung der Selektivität gegenüber DYRK1A im Vergleich zur Leitstruktur **25** zu erzielen, wurde darüber hinaus für das von Harmin **25** koinhibierte Enzym MAO-A ein Protein/Liganden-Docking erstellt. Hiermit konnten drei synthetisierte Derivate ausgewählt werden, die im Hinblick auf ihre Aktivität gegenüber MAO-A evaluiert wurden. Dabei wurde die N-H-Position als favorisierbare Position für Derivatisierungen von potenten DYRK1A-Inhibitoren zur Erhöhung der Selektivität identifiziert. Das synthetisierte *N*-Heptylharmin **157** inhibiert DYRK1A potenter und beeinflusst MAO-A deutlich geringer als Harmin **25** (Abbildung 99).



157 BSc5072

%-Inhibition (DYRK1A) = 98
 %-Inhibition(MAO-A) = 17

Abbildung 99: Strukturformel und biologische Daten des potentesten und selektivsten DYRK1A-Inhibitors **157**.

Ausblick

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht alle Positionen des β -Carbolingrundgerüsts auf ihre Struktur-Aktivitäts-Beziehung untersucht wurden sind diesbezüglich noch weitere Derivatisierungen denkbar (Abbildung 100).

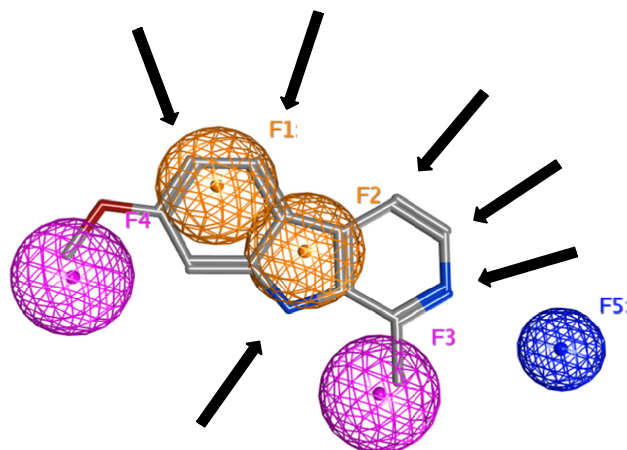


Abbildung 100: Mögliche Positionen für weitere Derivatisierungen.

So sollte die favorisierte N-H-Position mit Substituenten dargestellt werden, die einerseits die Löslichkeit verbessern und andererseits die Selektivität weiter erhöhen. Hierfür wären langkettige PEG-Seitenketten oder andere sterisch-anspruchsvolle und polare Funktionen einsetzbar. Die Untersuchung der Notwendigkeit des Akzeptors wäre anhand eines analogen Carbazolderivats möglich. Des Weiteren könnte das aromatische System des Indols ausgetauscht werden um ggf. zusätzliche Interaktionen des Grundgerüsts zu ermöglichen.

Neben den weiteren Derivatisierungen zur Verbesserung der Aktivität und Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollte zudem die Selektivität weiter evaluiert werden. Da die Koinhibition von MAO-A die meisten Nebeneffekte verursacht, wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf dieses Enzym gelegt. Allerdings inhibiert Harmin **25** auch die verwandten Kinasen DYRK1B, DYRK2 und DYRK3, wobei diese um das Zehnfache schwächer inhibiert werden und somit kein bevorzugtes Ziel von Harmin **25** darstellen. Dennoch sollten neue DYRK1A-Inhibitoren auch hinsichtlich der Aktivität gegenüber diesen verwandten Kinasen analysiert werden.

In Bezug auf die klinische Anwendbarkeit von DYRK1A-Inhibitoren müsste wie bereits beschrieben, die Löslichkeit verbessert werden, was durch polare Substituenten erreichbar wäre. Aber auch die Verweilzeit im Körper ist ein wichtiges Kriterium: Wird der Wirkstoff zu schnell abgebaut, könnte die notwendige Wirkkonzentration nicht erreicht werden. Deshalb

muss die Abbaugeschwindigkeit eines neuen DYRK1A-Inhibitors durch entsprechende Enzyme, wie z. B. Cytochrom P450, ermittelt und mögliche Derivatisierungen zu dessen Reduzierung vorgenommen werden.

Abseits der Weiterentwicklung der DYRK1A-Inhibitoren kann das Konzept der Erstellung eines computerbasierten Pharmakophormodells und Protein/Liganden-Dockings zur Evaluation von Struktur-Aktivitäts-Beziehung, bereits vor der Synthese von potenten Derivaten, für zahlreiche andere Kinasen, wie z. B. die ebenfalls für die Entstehung von AD verdächtige Kinase GSK-3, eingesetzt werden. Dadurch würde nicht nur der Synthesaufwand deutlich verringert, sondern auch die Kosten gesenkt und die Umwelt geschont werden.

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben wurde, sind die Carbazole und Analoga, wie die Carboline, eine beliebte Leitstruktur in der medizinischen Forschung. In einer Studie von Siemens Medical Solutions USA, Inc., wurden Carboline als Tau-Liganden eingesetzt, die entsprechend markiert zur Lokalisation von Tau durch PET benutzt werden können.^{148, 149} Basierend auf dieser Information sollten die dargestellten β -Carbolinderivate auf ihre Affinität gegenüber Tau und A β -Peptiden untersucht werden. Denn auch bei der Entwicklung neuer Tau-Liganden dürfen die bindenden Wirkstoffe MAO-A nicht inhibieren, welches auch hier zu nicht vertretbaren Nebeneffekten führen würde. Womöglich wären die in dieser Arbeit synthetisierten Derivate als dualer Wirkstoff einsetzbar, der Tau lokalisiert und die Phosphorylierung durch DYRK1A, durch direkte Inhibition, hemmt. Dadurch würde die Bildung von NFTs reduziert werden und keine MAO-A-induzierten Begleit-Symptome würden hervorgerufen werden.

3.3. Untersuchungen von ADAM10 Funktionen mit Hilfe des selektiven Inhibitors GI254023X **91**

3.3.1. Einleitung

Eine häufig vorgeschlagene Strategie zur Behandlung von AD ist die Aktivierung der α -Sekretase (ADAM10) und die damit verbundene Steigerung der APP-Prozessierung entlang des nicht-amyloiden Wegs. Dadurch soll vermehrt das lösliche APP-Fragment, APP α , welches über neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften verfügt, gebildet werden. Es wird erwartet, dass gleichzeitig die Prozessierung über den amyloiden Weg und somit die Abspaltung der toxischen A β -Peptide vermindert wird. Allerdings erscheint diese Strategie in Anbetracht der stetig neu identifizierten Substrate und Funktion, die mit Problemen wie nicht tolerierbaren Nebeneffekten verbunden sind, derzeit nur eingeschränkt anwendbar (siehe Kapitel 1.5). Bevor weitere Bemühungen hinsichtlich der Entwicklung von Wirkstoffen und Methoden zur Aktivierung fortgesetzt werden, ist eine möglichst detaillierte Erforschung der physiologischen Vorgänge, in die ADAM10 involviert ist, notwendig. Für die Untersuchung der Zusammenhänge mit der Aktivität von ADAM10 kann der einzig selektive ADAM10-Inhibitor, GI254023X **91**, eingesetzt werden. Zusätzlich ist die Inhibition von ADAM10 ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Entzündungsreaktionen und Krebserkrankungen.

Die Synthese von GI254023X **91** konnte in Vorarbeiten von Dr. Hoettecke im Arbeitskreis von Prof. Schmidt verbessert werden (Abbildung 44).²³⁵ Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Inhibitor **91** in hoher Qualität dargestellt, was die Voraussetzung für valide biologische Untersuchungen und den damit verbundenen Einsatz im Zell- und Tiermodell ist.

Die Reinigung der Endstufe konnte durch Kombination von präoperativen HPLC-Methoden und Einsatz von automatisierter Flash-Chromatographie im größeren Maßstab erzielt werden. Da der Inhibitor **91** nur sehr geringe UV-Aktivität aufweist, wurden ergänzend Färbereagenzien zur Detektion des Produktes und Nebenproduktes benutzt (siehe Kapitel 5.1.1). Nur qualitativ hochwertige Substanzproben wurden für die Untersuchung physiologischer Zusammenhänge benutzt. Dies wurde durch den Einsatz von mehreren Charakterisierungsmethoden (HPLC, NMR, MS) sicher gestellt.

Die biologischen Untersuchungen wurden aufgrund der diesbezüglich eingeschränkten Möglichkeiten im größtenteils organisch-chemisch arbeitenden Arbeitskreis von Prof. Schmidt, in Kooperation mit entsprechend hierfür spezialisierten Forschergruppen durchgeführt. Die Erstellung der für Zusammenarbeiten erforderlichen rechtlichen Vereinbarungen war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Dazu gehört auch die Überprüfung der geplanten

Experimente auf Konformität mit dem Tierschutzgesetz und Beantragung der Genehmigung der selbigen durch die Ethikkommission der Technischen Universität Darmstadt. Wenn der Austausch des geplanten Modells möglich war, wurden orthologe, weniger kritische Modelle, wie beispielsweise Zebrafischlarven, empfohlen. Desweiteren erfolgte eine Beratung zu den geplanten experimentellen Arbeiten in Bezug auf die Dosierung, Formulierung, Handhabung und Lagerung des Wirkstoffes **91**.

Aus den Ergebnissen der in Kooperation durchgeführten Arbeiten konnten vier Publikationen erstellt werden, die in den folgenden Abschnitten zusammengefasst und angehängt sind.

3.3.2. Eine evolutionär frühzeitige neuroepitheliale Zelladhäsions-Funktion von Huntingtin impliziert ADAM10 und N-Cadherin

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:²⁸⁹

Autoren: Valentina Lo Sardo, Chiara Zuccato, Germano Gaudenzi, Barbara Vitali, Catarina Ramos, Marzia Tartari, Michael A. Myre, James A. Walker, Anna Pistocchi, Luciano Conti, Marta Valenza, Binia Drung, Boris Schmidt, James Gusella, Scott Zeitlin, Franco Cotelli, Elena Cattaneo.

Titel: „An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin“.

Journal: Nature Neuroscience, **2012**, 15, 5, 713-721.

DOI: 10.1038/nn.3080.

Mit freundlicher Genehmigung von der Nature Publishing Group [Copyright © 2012].

Zusammenfassung:

Huntingtin (htt) ist ein Protein, welches bei zusätzlicher Polyglutaminausdehnung zu Chorea Huntington (*huntington's disease*, HD) führt.

Die unmutierte Variante erfüllt zahlreiche physiologische Aufgaben. In Säugetieren wird das Protein in den frühen Stadien nach der Befruchtung exprimiert und im sich entwickelnden sowie adulten Gehirn angereichert. Dort fördert htt die Transkription von neuronalen Genen, den Vesikel-Transport und die Transportvorgänge entlang von Axonen. Zusätzlich zeigt das Protein eine anti-apoptotische Wirkung in Gehirngewebe sowie in neuronalen und peripheren Zellen. Während der Embryogenese ist htt unerlässlich für die Bildung des Neuralrohrs,

welches die Vorstufe des ZNS darstellt. Allerdings ist der genaue zelluläre und molekulare Mechanismus bis heute weitgehend unbekannt.

Durch Untersuchungen der Neurulation an *htt*-mangelnden (*htt*-null) embryonalen Stammzellen und *htt-knockdown* Zebrafischlarven konnte eine bisher unbekannte Funktion des *htt*-Proteins identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass *htt* homotypische Interaktionen zwischen Zellen des Neuroepithels reguliert, indem die ADAM10-Aktivität und die N-Cadherin-Spaltung inhibiert werden. Als Kontrollversuch *in vivo* wurden *htt-knockdown* Zebrafischlarven, die phenotypische Veränderungen, zu denen auch Defekte in der Neuralrohrbildung gehören, aufweisen, mit dem bekannten ADAM10-Inhibitor GI254023X **91** behandelt. Die teils sehr stark ausgeprägten phenotypischen Merkmale der *htt-knockdown* Larven, die als Kontrollen nur mit DMSO versetzt wurden, konnten durch Applikation von 40 μ M GI254023X **91** beseitigt werden. Darüber hinaus wurden in Proben mit dem Inhibitor kaum Defekte in der Neuralrohrbildung beobachtet.

Zusätzlich konnte die Codierung dieser ADAM10- und N-Cadherin-regulierenden Funktion in der neuronalen Zelladhäsion innerhalb der ersten 500 Aminosäuren des N-Terminus lokalisiert werden.

Durch die Analyse von *htt*-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen wurde gezeigt, dass die anti-apoptotische Aktivität eine evolutionär frühzeitig vorhandene Funktion darstellt. Im Gegensatz hierzu tritt die Anlage der zelladhäsions-regulierenden Aktivität erst mit fortschreitender evolutionärer Entwicklung, ab niedrigen Deuterostomia, auf und setzt sich über Fische bis zu den Säugetieren fort.

Synthetischer Beitrag zur Arbeit: GI254023X **91** (+ siehe Kapitel 3.3.1).

An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin

Valentina Lo Sardo^{1,7}, Chiara Zuccato^{1,7}, Germano Gaudenzi², Barbara Vitali¹, Catarina Ramos^{1,6}, Marzia Tartari¹, Michael A Myre³, James A Walker³, Anna Pistocchi², Luciano Conti¹, Marta Valenza¹, Binia Drung⁴, Boris Schmidt⁴, James Gusella³, Scott Zeitlin⁵, Franco Cotelli² & Elena Cattaneo¹

The Huntington's disease gene product, huntingtin, is indispensable for neural tube formation, but its role is obscure. We studied neurulation in htt-null embryonic stem cells and htt-morpholino zebrafish embryos and found a previously unknown, evolutionarily recent function for this ancient protein. We found that htt was essential for homotypic interactions between neuroepithelial cells; it permitted neurulation and rosette formation by regulating metalloprotease ADAM10 activity and Ncadherin cleavage. This function was embedded in the N terminus of htt and was phenocopied by treatment of htt knockdown zebrafish with an ADAM10 inhibitor. Notably, in htt-null cells, reversion of the rosetteless phenotype occurred only with expression of evolutionarily recent htt heterologues from deuterostome organisms. Conversely, all of the heterologues that we tested, including htt from *Drosophila melanogaster* and *Dictyostelium discoideum*, exhibited anti-apoptotic activity. Thus, anti-apoptosis may have been one of htt's ancestral function(s), but, in deuterostomes, htt evolved to acquire a unique regulatory activity for controlling neural adhesion via ADAM10-Ncadherin, with implications for brain evolution and development.

Huntingtin (htt) is the 3,144 amino acid protein encoded by *Hdh* (also known as *Htt*). *Hdh* contains a polymorphic tri-nucleotide CAG repeat that is translated into polyglutamine amino acid (polyQ) residues in htt. When this polyQ stretch at the 18 amino acid position expands to over 39 residues, Huntington's disease occurs, a fatal, genetically dominant, neurodegenerative disease¹. The CAG repeats are conserved in deuterostomes, which suggests that they are an ancestral feature that was retained during htt evolution². Consequently, htt is found in *Dictyostelium discoideum*, a lower metazoa at the base of the protostome-deuterostome divergence^{3,4}. In *D. discoideum*, however, the protein carries no glutamine at this location and no glutamines are present in protostomes. As evolution progressed, two glutamines appeared in the htt of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*)². Thereafter, glutamines have been maintained in the same position, but have progressively expanded during deuterostome evolution.

In mammals, htt is expressed in the early post-fertilization stages and becomes enriched in the developing and adult brain⁵, where it carries out a number of brain-specific activities. It promotes the transcription of neuronal genes, vesicle trafficking and axonal transport⁶. It also acts as an anti-apoptotic protein in brain tissue^{7–10} and in cultured neural and peripheral cells^{11–13}. During embryogenesis, htt is critical for gastrulation^{14–17} and neurogenesis. When htt expression is experimentally reduced to below 50% of wild-type levels, defects in the epiblast are observed^{18,19}. In the htt knockdown zebrafish embryo, defects are found in the most anterior regions of the neural plate²⁰.

Later in development, neuroblasts in the telencephalon must synthesize htt to progress correctly through differentiation²¹. This might depend on a recent finding that htt regulates mitotic spindle orientation in the developing mammalian cortex, an activity that can affect cortical progenitor cell fate decisions²². Despite this knowledge, the exact cellular and molecular functions that make htt indispensable for neural tube formation and brain morphogenesis remain largely obscure.

We investigated the function of htt by studying htt-deficient mouse embryonic stem (ES) cells that form neural rosettes, radial arrangements of columnar cells that express many of the proteins found in the neuroepithelium *in vivo*^{23,24}. We found that, during neurulation, htt favored homotypic interactions between neuroepithelial cells by inhibiting both the activity of the metalloprotease ADAM10 and Ncadherin cleavage. This also occurred *in vivo*, as defects in neural tube morphogenesis that were observed in htt knockdown zebrafish (*Danio rerio*) embryos could be rescued after treatment with GI254023X, an ADAM10 inhibitor²⁵.

Finally, we found that this neural cell adhesion function of htt is embedded in its first ~500 amino acids and is unique to late deuterostomes, as htt from a protostome homolog and from more ancient organisms in the deuterostome branch that have a low degree of nervous system centralization could not complement the *rosetteless* phenotype in htt-null ES cells. We conclude that, during deuterostome evolution, particularly after cephalochordate emergence,

¹Department of Pharmacological Sciences and Centre for Stem Cell Research, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy. ²Department of Biology, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy. ³Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA. ⁴Clemens Schöpf Institute of Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Germany. ⁵Department of Neuroscience, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia, USA. ⁶Present address: Instituto de Medicina Molecular, Av. Prof. Egas Moniz, Lisboa, Portugal. ⁷These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to E.C. (elena.cattaneo@unimi.it).

Received 14 November 2011; accepted 5 March 2012; published online 1 April 2012; corrected online 10 August 2012; doi:10.1038/nn.3080



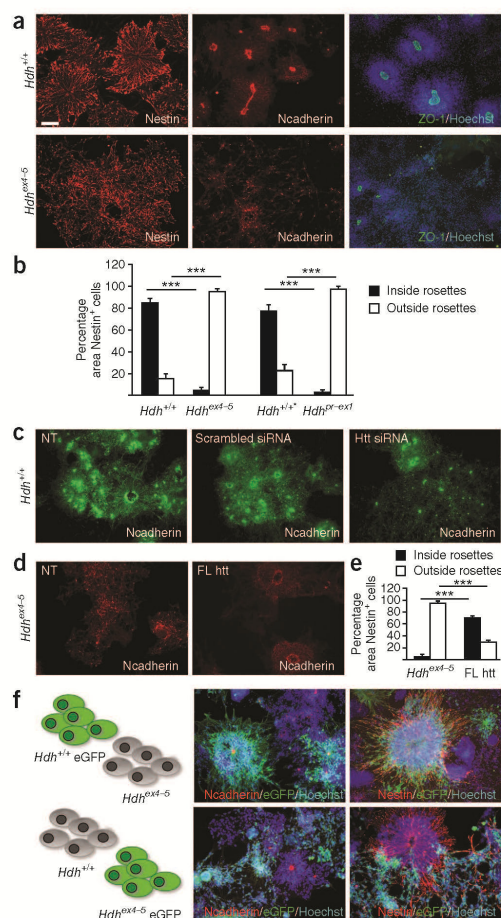
Figure 1 Neural differentiation of htt-null mouse ES cells. (a) htt-null ($Hdh^{ex4-5/14}$) and wild-type ($Hdh^{+/+}$) ES cells were immunostained with Nestin, Ncadherin and ZO-1/Hoechst. (b) Quantification of the rosetteless phenotype in htt-null and wild-type cells. Data are the mean \pm s.e.m. of five independent experiments for Hdh^{ex4-5} and $Hdh^{+/+}$ cells and from three independent experiments for Hdh^{pr-ex1} and $Hdh^{+/+}$ cells. *** $P < 0.0001$. $Hdh^{+/+}$ and Hdh^{ex4-5} cells are two different batches of wild-type ES cells. (c) htt depletion with siRNA in $Hdh^{+/+}$ cells. NT, not transfected with siRNA. (d) Expression of mouse full-length htt (FL htt) in Hdh^{ex4-5} cells. NT, not transfected. (e) Quantification of neural rosettes after mouse full-length htt expression in Hdh^{ex4-5} cells. Data are the mean \pm s.e.m. of three independent experiments. (f) Top, $Hdh^{+/+}$ eGFP-labeled cells were co-cultured with an equal amount of unlabeled Hdh^{ex4-5} cells. Bottom, $Hdh^{+/+}$ cells were co-cultured with an equal number of eGFP-labeled Hdh^{ex4-5} cells (Hdh^{ex4-5} eGFP). Co-cultures were immunostained for eGFP, Hoechst and either Ncadherin or Nestin. All immunostaining was conducted on day 8 of neural differentiation. P values were determined by two-tailed, unpaired t test. Scale bar indicates 75 μ m.

htt acquired a cell-adhesion function that is critical for neurulation and that depends on ADAM10 activity.

RESULTS

htt controls interactions between neuroepithelial cells

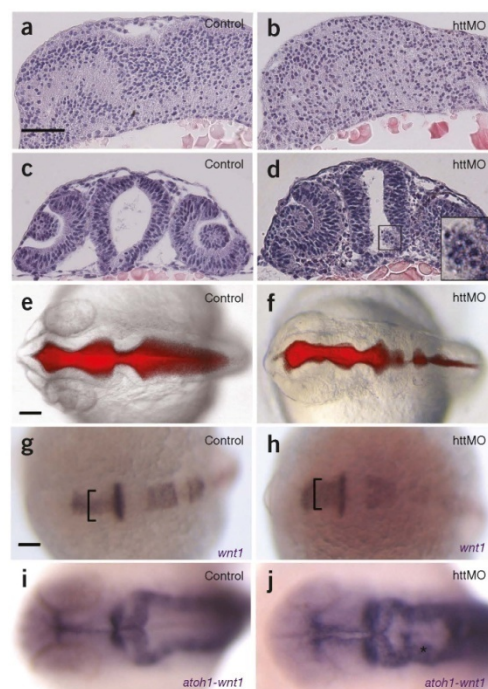
ES cells that expressed either wild-type htt ($Hdh^{+/+}$ cells) or no htt (Hdh^{ex4-5} cells)¹⁴ were subjected to a monolayer neural differentiation protocol that converts ES cells into neuroepithelial progenitors that resemble those present *in vivo* at the time of neural plate closure and neural tube formation²⁶. $Hdh^{+/+}$ cells typically formed neuroepithelial rosettes between days 5 and 7 of differentiation (Fig. 1a), which consist of neuroepithelial cells that express the neural stem cell marker Nestin and the apical markers Ncadherin and ZO-1 (ref. 26). In contrast, differentiated Hdh^{ex4-5} cells generated neuroepithelial cells with aberrant spatial organization, and these cultures were nearly devoid of properly formed rosettes (Fig. 1a and Supplementary Videos 1 and 2). We termed this phenotype rosetteless because these cells never reverted to normal rosettes formation. Furthermore, Hdh^{ex4-5} cells did not display the typical luminal staining of Ncadherin and ZO-1 (Fig. 1a), which suggests that the loss of htt leads to defects in neuroepithelial cell polarization during *in vitro* neurulation. Identical results were obtained using a different htt-null ES cell line (Hdh^{pr-ex1})¹⁶ (Supplementary Fig. 1). This phenotype did not depend on defects in neural induction, as judged by Sox1 immunoreactivity, which was similar in the two genotypes (Supplementary Fig. 1), or on cell density, as increasing amount of Hdh^{ex4-5} cells did not lead to rosettes formation (Supplementary Fig. 1). In addition, in control $Hdh^{+/+}$ cultures, the majority ($84.4 \pm 3.9\%$) of Nestin⁺ cells were organized in rosettes; in contrast, in Hdh^{ex4-5} cells, $95.2 \pm 1.2\%$ of the Nestin⁺ cells were dispersed outside of the defective rosette structures on day 8 of monolayer differentiation (Fig. 1b). The rare rosette-like formations that were present in knockout cells were smaller in size than $Hdh^{+/+}$ rosettes on day 8 (Hdh^{ex4-5} , 80–150 μ m; $Hdh^{+/+}$, 300–500 μ m). Furthermore, when htt expression was blocked by injecting htt-specific small interfering RNA (siRNA) into $Hdh^{+/+}$ cells 24 h before neural differentiation was initiated (Supplementary Fig. 2), we observed a reduction in rosettes number and size on day 8 compared with cells treated with scrambled siRNA (Fig. 1c). Finally, expression of exogenous full-length mouse htt from day 0 or acutely at day 2 or 3 (but not later) led to a substantial rescue of the rosetteless phenotype in Hdh^{ex4-5} cells (Fig. 1d), as $70 \pm 3\%$ of Nestin⁺ cells were found organized inside the rosettes (Fig. 1e and Supplementary Fig. 3). These data indicate that htt is required for the organization of neuroepithelial cells into neural rosettes and that the loss of htt alters this process.



To test whether htt's function during rosette formation is cell-autonomous, we established a co-culture system composed of equal amounts of $Hdh^{+/+}$ and Hdh^{ex4-5} ES cells, and modified one of the cell types for stable expression of enhanced green fluorescent protein (eGFP). In a non-cell-autonomous mechanism, we expect that the presence of $Hdh^{+/+}$ cells would induce Hdh^{ex4-5} cells to form rosettes or that Hdh^{ex4-5} cells might be trapped in $Hdh^{+/+}$ rosettes. Instead, neural rosettes were always exclusively composed of $Hdh^{+/+}$ cells (Fig. 1f and Supplementary Video 3), and Hdh^{ex4-5} cells were unable to form neural rosettes, even in the presence of $Hdh^{+/+}$ cells. We concluded that the ability of htt to promote rosette formation is cell-autonomous.

We next tested the effects of knocking down htt during neural tube morphogenesis in zebrafish by injecting zebrafish embryos with a translation-blocking morpholino oligonucleotide that specifically targeted htt (httMO)²⁷. Four categories of embryos, which we termed class 1–4, were generated. Class 1 morphants were similar to control embryos and class 2 morphants showed a reduction of the cephalic region and an attempt of tail curvature that developed into an altered

Figure 2 Neural tube impairment in *htt* loss-of-function zebrafish embryos. (a,b) Sagittal sections of control and *htt* knockdown zebrafish embryos (*httMO*) at somite stage 10 (14 hpf) stained with haematoxylin and eosin. (c,d) Cross-sections of the neural tube in control and *httMO* embryos at 24 hpf. (e,f) Control and *httMO* brain ventricles injected with rhodamine and dextran at 24 hpf. One representative section of ~100 morphant and control embryos subjected to four independent *httMO* injections is shown. (g,h) *wnt1* whole-mount *in situ* hybridization at somite stage 7–8, dorsal view with anterior to the left. The brackets indicate the expansion of the midbrain *wnt1* expression domain in *httMO* in comparison with control embryos. (i,j) *wnt1* and *atoh1* double whole-mount *in situ* hybridization at 24 hpf, dorsal view with anterior to the left. Midbrain roofplate and rhombomeric boundaries of *httMO* embryos were disorganized and fused anteriorly in comparison with controls. Asterisk indicates the disorganization of the hindbrain region. Scale bars indicate 50 μ m.



body plan in class 3 and class 4 morphants (Supplementary Fig. 4). We next examined neural tube morphogenesis in control and *httMO*-injected embryos. Defects in *httMO* became apparent from somite stage 7–8, after the onset of neurulation, and persisted until 24 hours post-fertilization (hpf) (Fig. 2a–d and Supplementary Fig. 5). In particular, longitudinal sections of embryos at somite stage 10 (14 hpf) revealed that neural progenitor cells in the cephalic region were less clustered in *httMO*-treated embryos than in control embryos (Fig. 2a,b). Moreover, at 24 hpf, *httMO*-injected embryos displayed a compromised structure of the neural tube at the level of the diencephalons (Fig. 2c,d and Supplementary Fig. 5), with clusters of mispositioned cells and cellular aggregates in the ventricles (Fig. 2d and Supplementary Fig. 5). Furthermore, morphants displayed an altered brain ventricular space and a reduced cephalic region compared with control embryos (Fig. 2e,f). Expression domains of *wnt1*, which labels the prospective roof plate in the dorsal midbrain and hindbrain²⁸, and *atoh1*, which labels rhombomeric boundaries²⁹, were altered in *httMO*-injected embryos compared with control embryos (Fig. 2g–j), suggesting defects occurred in neural tube shaping and opening. Alteration of the *atoh1* expression domain suggests that the left and right side of the neural tube do not open uniformly in the hindbrain of *httMO*, consistent with our finding of abnormal neural tube shape (Fig. 2e,f). Finally, immunohistochemistry for ZO-1 in *httMO*-treated embryos at 24 hpf, a stage at which ZO-1 becomes enriched at the midline in anterior region of the developing neural tube, revealed either a disorganized (Supplementary Fig. 5) or reduced (data not shown) ZO-1 signal in neuroepithelial cells. These data suggest that the loss of *htt* leads to defects in neuroepithelial cell organization and apico-basal polarity during neurulation, which compromise the integrity of the neural tube.

htt regulates ADAM10/Ncadherin cell-anchoring mechanisms

We next tested whether the observed defects in neuroepithelial cell organization in the absence of *htt* could be linked to a defect in the motility of *htt*-null cells and performed time-lapse recording of *Hdh*^{+/+} and *Hdh*^{ex4-5} cells during the process of rosettes formation. Cellular motility did not change significantly in *htt*-null cells (*Hdh*^{+/+}, $0.34 \pm 0.03 \mu\text{m min}^{-1}$; *Hdh*^{ex4-5}, $0.28 \pm 0.03 \mu\text{m min}^{-1}$; mean of two independent experiments, $P = 0.19$, two-tailed unpaired *t* test). We reasoned that *htt* may participate in cell-cell adhesion mechanisms that contribute to *htt*'s function in neural rosette formation.

Ncadherin (cadherin2, *Ncad*) is a protein that is typically found in adherent junctions³⁰. It is involved in the regulation of cell adhesion and migration in the CNS³⁰ and is essential for neurulation³¹. Its cleavage by ADAM10 regulates cell adhesion and this generates an N-terminal, 95-kDa fragment and a C-terminal, 40-kDa fragment

(CTF1); CTF1 is processed further by the presenilin and γ -secretase complex into a soluble 35-kDa fragment (CTF2)^{32,33}. We first tested whether Ncadherin functioned downstream of normal *htt* signaling by evaluating its expression in *Hdh*^{+/+} and *Hdh*^{ex4-5} cells at day 8 of monolayer differentiation. We found no differences between genotypes in full-length Ncadherin levels (Fig. 3a). However, we observed a five-fold increase in the level of the CTF1 fragment present in *Hdh*^{ex4-5} compared with *Hdh*^{+/+} cultures (Fig. 3a). This was confirmed in *Hdh*^{pr-ex1} neuroepithelial cells compared with *Hdh*^{+/+} cells (Fig. 3a,b). CTF1 levels were significantly higher in *Hdh*^{ex4-5} cultures than in *Hdh*^{+/+} cultures at earlier time points (days 5–7; $P < 0.05$ at day 5, $P < 0.01$ at days 6 and 7; Supplementary Fig. 6). As expected, Ncadherin was not expressed in self-renewing ES cells (day 0; Supplementary Fig. 6).

ADAM10 is the metalloprotease that is primarily responsible for Ncadherin cleavage³². Western blotting for ADAM10 in *Hdh*^{+/+} cells (Fig. 3c) revealed the three expected immunoreactive bands of 100, 80 and 60 kDa, corresponding to the full-length ADAM10 precursor (full-length ADAM10), the partially processed (inactive) form (p-ADAM10) and the catalytically active protein (m-ADAM10), respectively. The amount of full-length ADAM10 was reduced at day 8 in *Hdh*^{ex4-5} cultures compared with *Hdh*^{+/+} (Fig. 3c). Conversely, *Hdh*^{ex4-5} cells had increased levels of m-ADAM10 and p-ADAM10 (Fig. 3c); in particular, m-ADAM10 expression was increased 3.0 ± 0.6 -fold in *Hdh*^{ex4-5} compared with *Hdh*^{+/+} cultures on day 8 (Fig. 3c). To determine whether the catalytic portion of ADAM10 was irreversibly compromised in *htt*-null cells, we treated *Hdh*^{ex4-5} cultures with the tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP1), an ADAM10 inhibitor. We found that the formation of CTF1 was prevented in

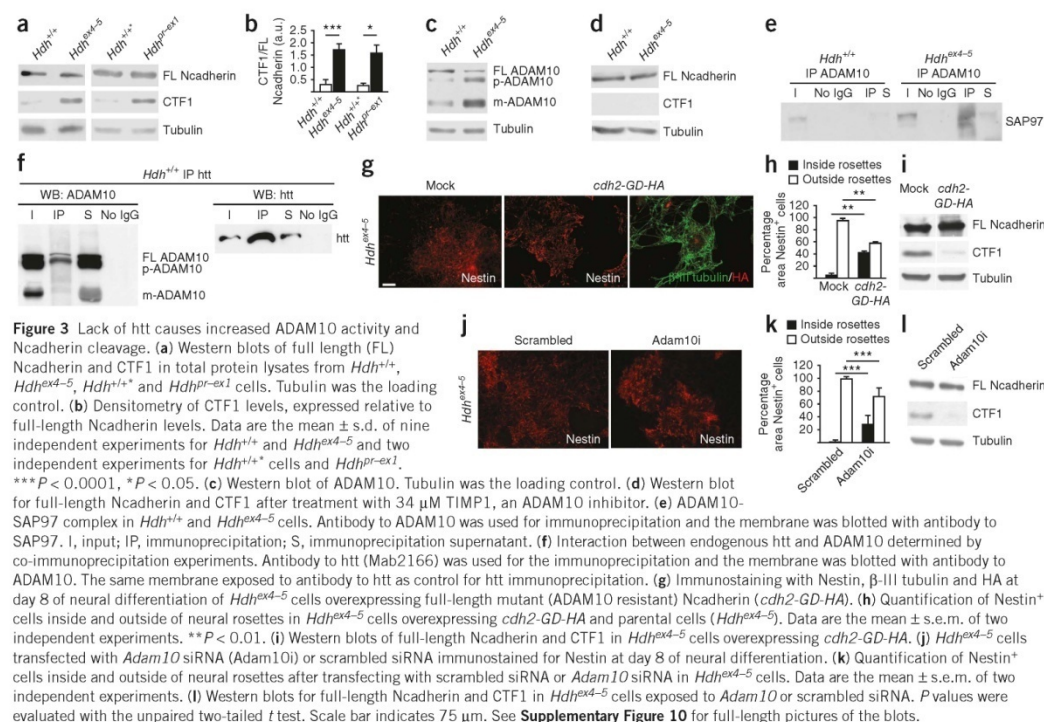


Figure 3 Lack of htt causes increased ADAM10 activity and Ncadherin cleavage. **(a)** Western blots of full length (FL) Ncadherin and CTF1 in total protein lysates from *Hdh^{+/+}*, *Hdh^{ex4-5}*, *Hdh^{pr-ex1}* and *Hdh^{pr-ex1}* cells. Tubulin was the loading control. **(b)** Densitometry of CTF1 levels, expressed relative to full-length Ncadherin levels. Data are the mean \pm s.d. of nine independent experiments for *Hdh^{+/+}* and *Hdh^{ex4-5}* and two independent experiments for *Hdh^{pr-ex1}* cells and *Hdh^{pr-ex1}*. *** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$. **(c)** Western blot of ADAM10. Tubulin was the loading control. **(d)** Western blot for full-length Ncadherin and CTF1 after treatment with 34 μ M TIMP1, an ADAM10 inhibitor. **(e)** ADAM10-SAP97 complex in *Hdh^{+/+}* and *Hdh^{ex4-5}* cells. Antibody to ADAM10 was used for immunoprecipitation and the membrane was blotted with antibody to SAP97. I, input; IP, immunoprecipitation; S, immunoprecipitation supernatant. **(f)** Interaction between endogenous htt and ADAM10 determined by co-immunoprecipitation experiments. Antibody to htt (Mab2166) was used for the immunoprecipitation and the membrane was blotted with antibody to ADAM10. The same membrane exposed to antibody to htt as control for htt immunoprecipitation. **(g)** Immunostaining with Nestin, β -III tubulin and HA at day 8 of neural differentiation of *Hdh^{ex4-5}* cells overexpressing full-length mutant (ADAM10 resistant) Ncadherin (*cdh2-GD-HA*). **(h)** Quantification of Nestin⁺ cells inside and outside of neural rosettes in *Hdh^{ex4-5}* cells overexpressing *cdh2-GD-HA* and parental cells (*Hdh^{+/+}*). Data are the mean \pm s.e.m. of two independent experiments. ** $P < 0.01$. **(i)** Western blots of full-length Ncadherin and CTF1 in *Hdh^{ex4-5}* cells overexpressing *cdh2-GD-HA*. **(j)** *Hdh^{ex4-5}* cells transfected with *Adam10* siRNA (*Adam10i*) or scrambled siRNA immunostained for Nestin at day 8 of neural differentiation. **(k)** Quantification of Nestin⁺ cells inside and outside of neural rosettes after transfecting with scrambled siRNA or *Adam10* siRNA in *Hdh^{ex4-5}* cells. Data are the mean \pm s.e.m. of two independent experiments. **(l)** Western blots for full-length Ncadherin and CTF1 in *Hdh^{ex4-5}* cells exposed to *Adam10* or scrambled siRNA. *P* values were evaluated with the unpaired two-tailed *t* test. Scale bar indicates 75 μ m. See **Supplementary Figure 10** for full-length pictures of the blots.

htt-null cells (Fig. 3d). These data suggest that htt controls ADAM10-mediated cleavage of Ncadherin during rosettes formation.

Interaction with synapse-associated protein 97 (SAP97) promotes ADAM10 trafficking to the plasma membrane^{34,35}. The association of ADAM10 and SAP97 positively modulates ADAM10 activity and Ncadherin cleavage^{34,35}. On this basis, we investigated whether increased Ncadherin cleavage in the absence of htt was paralleled by increased formation of the ADAM10-SAP97 complex. Although the ADAM10-SAP97 complex was undetectable in *Hdh^{+/+}* cells at day 8 of the neurulation protocol, the complex formed in *Hdh^{ex4-5}* cells, as revealed by immunoprecipitation with an antibody to ADAM10 followed by western blotting with antibody to SAP97 (Fig. 3e). ADAM10 (mRNA) and SAP97 (mRNA and protein) levels were similar in the two genotypes (Supplementary Fig. 7). To test the possibility that htt may interact with ADAM10, we immunoprecipitated total protein lysates from *Hdh^{+/+}* at day 8 with antibody to htt and immunoblotted with antibody to ADAM10 (Fig. 3f). ADAM10 co-immunoprecipitated with endogenous htt (Fig. 3f), indicating that htt interacts directly or indirectly with ADAM10 to control ADAM10-dependent cleavage of Ncadherin and neuroepithelial cell adhesion. Overexpression of an HA-tagged mutant Ncadherin transgene (*cadherin 2, cdh2*) resistant to ADAM10 cleavage (*cdh2-GD-HA*)³⁶ was able to partially rescue the rosetteless phenotype of *Hdh^{ex4-5}* cells (% of Nestin⁺ cells inside rosettes: *Hdh^{ex4-5}* transfected with *cdh2-GD-HA*, 42.25 ± 2.37 ; *Hdh^{ex4-5}* mock, 4.7 ± 3.35 ; Fig. 3g,h). This result was accompanied by a 9.7 ± 0.4 -fold reduction in CTF1 fragment production in the partially rescued cells (Fig. 3i). We also found that transient knockdown of

Adam10 with siRNA in *Hdh^{ex4-5}* cells (Supplementary Fig. 2) caused incorporation of $28.32 \pm 13.37\%$ of Nestin⁺ cells inside the rosettes (Fig. 3j,k) and a concomitant 14.00 ± 0.13 -fold decrease in the CTF1 levels (Fig. 3l). These data further confirm that idea htt's control over neural rosette formation depends on the regulation of Ncadherin cleavage by preventing the formation of the ADAM10-SAP97 complex, which leads to a decrease in the expression of the activated form of ADAM10 at the plasma membrane.

We next tested the link between htt and Ncadherin and ADAM10 *in vivo*. Western blot analyses indicated that level of cleaved Ncadherin product was 2.6 ± 0.2 -fold higher in httMO-treated zebrafish embryos than in control (Fig. 4). This was consistent with an approximately two fold lower level of unprocessed Ncadherin in htt-null morphants compared with control embryos.

To further demonstrate that htt loss-of-function alters the adhesiveness of neuroectodermal cells during neurulation by influencing Ncadherin functionality, we analyzed those neural markers affected in the zebrafish *parachute* mutants, which carry potential null mutations in a zebrafish Ncadherin homolog. In *parachute* mutants, the loss of neural tube organization is restricted to alar regions whereas cells in the basal positions remain correctly organized³⁷. In our htt knockdown zebrafish embryos at somite stage 2–3, as is also seen in *parachute* mutants³⁷, the expression patterns of the floor plate marker *shh*, the alar-basal marker *pax2.1* and the roofplate marker *wnt1*, were indistinguishable from control embryos (Fig. 5a–f). In htt loss-of-function embryos, as well as in *parachute* mutants, the loss of neural tube organization became evident from somite stage

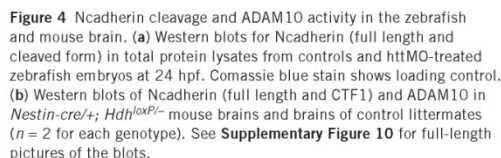


Figure 4 Ncadherin cleavage and ADAM10 activity in the zebrafish and mouse brain. (a) Western blots for Ncadherin (full length and cleaved form) in total protein lysates from controls and *httMO*-treated zebrafish embryos at 24 hpf. Coomassie blue stain shows loading control. (b) Western blots of Ncadherin (full length and CTF1) and ADAM10 in *Nestin-cre/+; Hdh^{loxP/+}* mouse brains and brains of control littermates ($n = 2$ for each genotype). See **Supplementary Figure 10** for full-length pictures of the blots.

GI254023X is a mammalian ADAM10 blocker that has been successfully used in mice³⁸ and in organisms that are evolutionarily close to zebrafish³⁹. Given that the amino acid sequence of the ADAM10 catalytic site is highly conserved between zebrafish and mice (89% amino acid identity), we used GI254023X to block ADAM10 in httMO zebrafish. Administration of 40 μ M GI254023X for 24 h led to a substantial morphological rescue of the httMO-treated embryos, as shown by the shift toward the less affected class 1 and 2 morphants (Fig. 6a–e). Moreover, GI254023X-treated embryos displayed a substantial reduction in the neural tube shape defects that were observed in morphants with only a few cells being found in the ventricular spaces (Fig. 6f–k).

htt has acquired cell-adhesion function during evolution

We next investigated whether a specific domain in htt confers control of cell-cell adhesion during mammalian neurulation. We focused on the ~500 amino acid N-terminal portion of htt¹¹, as it has evolved more recently based on its divergence from *Ciona intestinalis* and *Drosophila melanogaster* htt, which lack the polyQ motif². In contrast, the 650 amino acid C terminus of htt is highly conserved among all animals². Notably, we found that constitutive expression of the 548 amino acid N terminus of mouse htt (*Mus musculus*) in *Hdh^{exd-5}* cells nearly completely rescued the rosetteless phenotype (Fig. 7a,b).

We next investigated whether htt pro-rosette activity was present in ancestral organisms from the lower parts of the evolutionary tree. We performed complementation assays in *Hdh^{ex4-5}* cells by expressing N-terminal htt fragments derived from ancient and more recently evolved species in the deuterostome and protostome branches (**Supplementary Fig. 9**). In particular, we tested htt from *D. discoideum* (N569 portion), a motile soil amoeba with no nervous system that emerged at the point of transition from unicellular to multicellular organisms, from the echinoderm, *S. purpuratus* (N519 portion), which has a primitive nervous system organized into a radial nerve, from the tunicate *C. intestinalis* (N409 portion), a chordate-invertebrate that has a body plan and embryonic development very similar to those of vertebrates, but is highly divergent at the adult stage from vertebrates in the structure of the nervous system, from the cephalochordate, lancelet *Branchiostoma floridae* (N478 portion), whose nervous system represents a first attempt of cephalization with an antero-posterior polarity, and from *D. rerio* (N517 portion), a vertebrate species. For controls, we included htt from *M. musculus* (N548 portion), *H. sapiens* (N652 portion) and a protostome, *D. melanogaster* (N548 portion), which follows a different type of developmental program for the structuring of its nervous system.

The cDNAs that encoded the htt N termini from *D. discoideum*, *S. purpuratus*, *C. intestinalis*, *B. floridae*, *D. rerio* and *D. melanogaster* were tagged with hemagglutinin (HA tag) and transfected into *Hdh^{ex4-5}* ES cells to generate stable *Hdh^{ex4-5}* ES cell lines. Immunocytochemical and western blotting analyses with antibodies to htt and HA confirmed the expression of the exogenous protein(s) in the different cell lines (Supplementary Fig. 9). We then

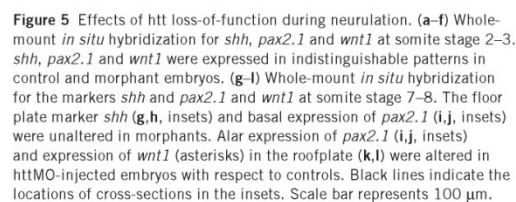
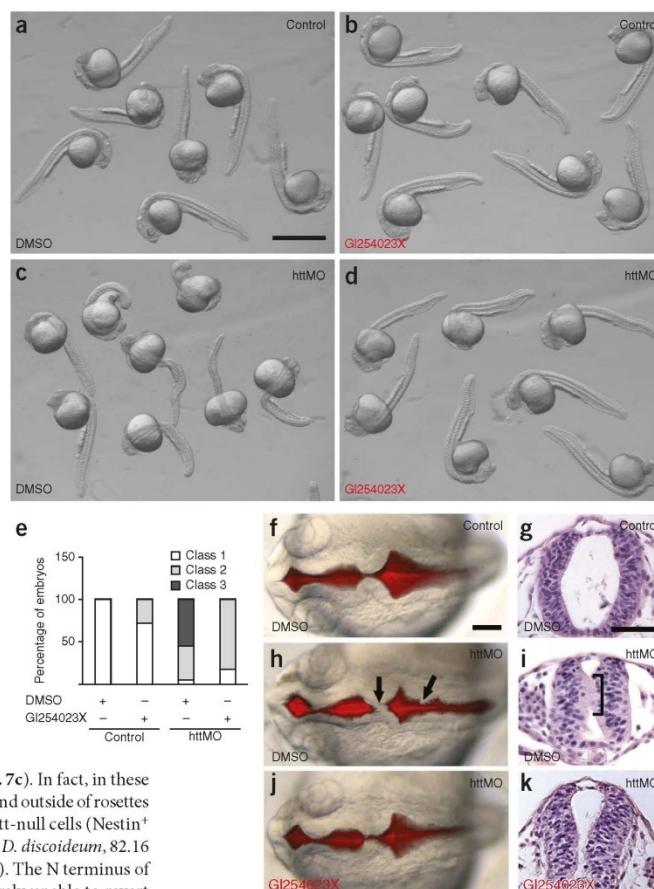


Figure 5 Effects of *htt* loss-of-function during neurulation. (a–f) Whole-mount *in situ* hybridization for *shh*, *pax2.1* and *wnt1* at somite stage 2–3. *shh*, *pax2.1* and *wnt1* were expressed in indistinguishable patterns in control and morphant embryos. (g–l) Whole-mount *in situ* hybridization for the markers *shh* and *pax2.1* and *wnt1* at somite stage 7–8. The floor plate marker *shh* (g, h, insets) and basal expression of *pax2.1* (i, j, insets) were unaltered in morphants. Alar expression of *pax2.1* (i, j, insets) and expression of *wnt1* (asterisks) in the roofplate (k, l) were altered in *httMO*-injected embryos with respect to controls. Black lines indicate the locations of cross-sections in the insets. Scale bar represents 100 μ m.

ARTICLES

Figure 6 The block of ADAM10 activity partially rescued httMO phenotypes at 24 hpf. **(a,b)** Both DMSO- and GI254023X-treated control embryos had normal morphology. **(c)** DMSO-treated httMO presented a strongly affected overall morphology at 24 hpf as a result of htt knockdown. **(d)** Structural defects of morphants were partially rescued by the application of 40 μ M GI254023X into the fish water. **(e)** Histogram shows the trend of a representative GI254023X treatment in which the block of ADAM10 activity determined the shift of the most affected phenotypic class 3 morphants toward the less affected phenotypic class 1 and 2 morphants; one of three independent experiments is shown that gave the same results. **(f,h,j)** Control, httMO-treated and httMO-GI254023X-treated embryos injected with rhodamine and dextran at 24 hpf. **(g,i,k)** Cross-sections of the neural tube in control, httMO-treated and httMO-GI254023X-treated embryos (class 1 and 2) at 24 hpf stained with haematoxylin and eosin. Defects in ventricular space and shape of httMO-treated embryos were partially recovered in 30% of the GI254023X-treated morphants. In particular, a significant reduction of mis-positioned cells was observed in the brain ventricles (black arrows in **h** and bracket in **i**). Scale bars represent 500 μ m (**a–d**) and 100 μ m (**f–k**).



subjected the cell lines to a monolayer differentiation protocol²⁶ and, on day 8, stained the cells for Ncadherin and Nestin. Notably, N-terminal htt proteins from distant species, including *D. discoideum* or *D. melanogaster*, were unable to complement the rosetteless phenotype when expressed in *Hdh^{ex4-5}* cells (Fig. 7c). In fact, in these cultures, the vast majority of Nestin⁺ cells were found outside of rosettes (Fig. 7d), similar to observations in cultures of htt-null cells (Nestin⁺ cells outside the rosettes: *Hdh^{ex4-5}*, 95.03 \pm 3.56%; *D. discoideum*, 82.16 \pm 9.21%; *D. melanogaster*, 84.58 \pm 2.00%; Fig. 7d). The N terminus of *S. purpuratus* and *C. intestinalis* htt was also largely unable to revert the rosetteless phenotype (Nestin⁺ cells outside the rosettes: *S. purpuratus*, 79.37 \pm 4.12%; *C. intestinalis*, 76.98 \pm 6.33%; Fig. 7d), although a few low-quality rosettes (that is, radially arranged neuroepithelial cells without a defined lumen and polarity) could be found. In contrast, transfection of htt from the more recently evolved species, *B. floridae*, *D. rerio*, *M. musculus* and *H. sapiens*, consistently resulted in a statistically significant and progressive reduction in the area occupied by Nestin⁺ cells outside of the rosettes compared with *Hdh^{ex4-5}* cells (*B. floridae*, 61.64 \pm 4.96%; *D. rerio*, 51.62 \pm 1.5%; *M. musculus*, 28.25 \pm 1.16%; *H. sapiens*, 22.80 \pm 8.98%; $P < 0.0001$, with respect to *Hdh^{ex4-5}* cells, according to one-way ANOVA with post-test Bonferroni; Fig. 7d). We also determined the size of rosettes by measuring the longer diameter at day 8. Rosettes were classified as normal size (that is, diameter > 150 μ m) and small (80 < diameter < 150 μ m). We observed that, also correlating with deuterostome evolution, the size of rosettes gradually increased in the following order: *D. melanogaster* = *D. discoideum* < *S. purpuratus* = *C. intestinalis* < *B. floridae* = *D. rerio* < *M. musculus* = *H. sapiens* (Fig. 7e). Accordingly, the propensity of Ncadherin cleavage, judged by CTF1 levels, decreased proportionally in *Hdh^{ex4-5}* cells that expressed htt from progressively more recently evolved species (Fig. 7f). In contrast, no substantial

differences in Ncadherin cleavage were observed among *D. melanogaster*, *D. discoideum*, *S. purpuratus*, *C. intestinalis* and null controls when normalized on tubulin levels (*Hdh^{ex4-5}* cells; Fig. 7f). Densitometric analyses on three independent western blots indicated that htt from *B. floridae*, *D. rerio*, *M. musculus* and *H. sapiens* showed 3.3 \pm 0.3, 8.0 \pm 2.0, 8.6 \pm 2.6 and 21.2 \pm 7.0-fold decreases, respectively, in CTF1 production compared with *Hdh^{ex4-5}* cells (Fig. 7f,g). Notably, the N terminus of both *D. melanogaster* and *D. discoideum* htt did not complement the rosetteless phenotype. On the basis of these data, we conclude that htt's control of cell adhesion is an evolutionarily recent acquisition of the protein that is specific to deuterostome organisms.

Previous studies have found that mammalian htt has an anti-apoptotic effect in neural and non-neural cells *in vitro*^{11–13} and in brain^{7,8}. This activity is embedded in the htt 548 amino acid N terminus¹¹. We investigated whether htt's anti-apoptotic activity is an ancestral or recent acquisition. To test this, we serum-deprived *Hdh^{ex4-5}* lines that stably expressed the N-terminal portions of htt homologs. In previous studies, this experimental condition led to an approximately 40% increase in caspase-3 activation in *Hdh^{ex4-5}* cells

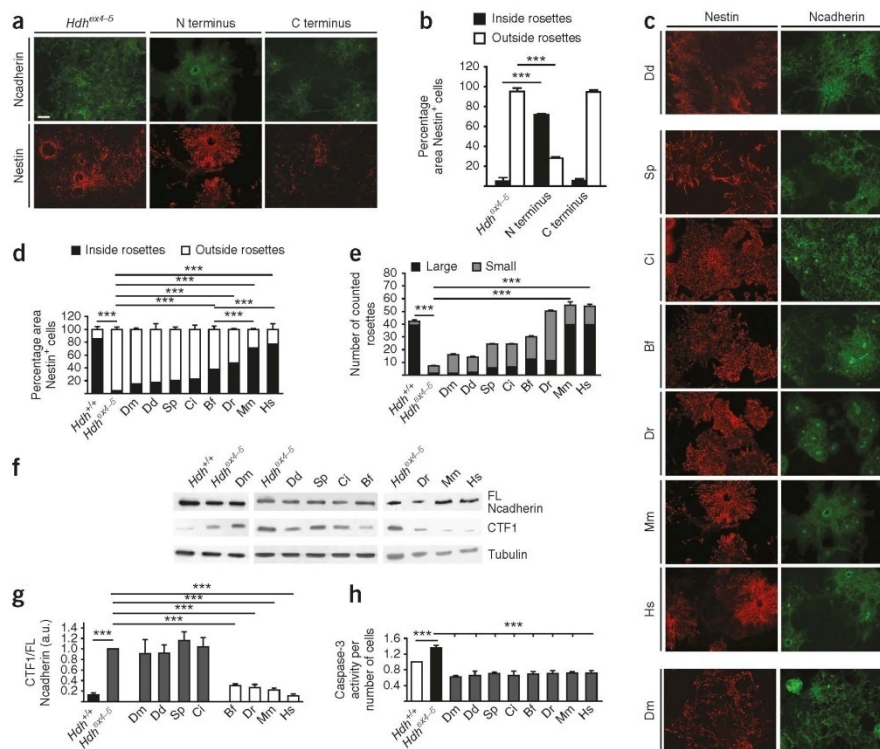


Figure 7 htt N terminus neural cell-adhesion function during evolution. **(a)** *Hdh^{ex4-5}* cells stably expressing the N terminus or C terminus of htt from *M. musculus* were immunostained for Ncadherin and Nestin on day 8 of monolayer differentiation. **(b)** Quantification of Nestin⁺ cells in *Hdh^{ex4-5}* cells expressing N-terminal or C-terminal fragments and parental cells. Data are the mean \pm s.d. from three independent experiments. *** $P < 0.0001$. **(c)** Immunostaining for Ncadherin and Nestin in *Hdh^{ex4-5}* cells stably expressing htt N terminus from *D. discoideum* (Dd), *S. purpuratus* (Sp), *C. intestinalis* (Ci), *B. floridae* (Bf), *D. rerio* (Dr), *M. musculus* (Mm), *H. sapiens* (Hs) or *D. melanogaster* (Dm). **(d)** Quantification of Nestin⁺ cells inside and outside of rosettes. **(e)** Mean rosette sizes. Data are the mean \pm s.d. of three independent experiments. **(f)** Western blots for full length Ncadherin and CTF1 in *Hdh^{ex4-5}* cells overexpressing htt N terminus from *D. discoideum*, *S. purpuratus*, *C. intestinalis*, *B. floridae*, *D. rerio*, *M. musculus*, *H. sapiens* and *D. melanogaster*. **(g)** Densitometry of CTF1 relative to full-length Ncadherin. Data are the mean \pm s.d. of three independent experiments. **(h)** Caspase-3 activity in *Hdh^{ex4-5}* cells expressing N-terminal *D. discoideum*, *S. purpuratus*, *C. intestinalis*, *B. floridae*, *D. rerio*, *M. musculus*, *H. sapiens* and *D. melanogaster* htt. Data are the mean \pm s.d. of three independent experiments. All P values were evaluated with one-way ANOVA with post-test Bonferroni. Scale bar indicates 75 μ M. See **Supplementary Figure 10** for full-length pictures of the blots.

compared with controls⁴⁰. We also found that caspase-3 activity was significantly increased in *Hdh^{ex4-5}* cells compared with *Hdh^{+/+}* cells ($P < 0.0001$, one-way ANOVA with post-test Bonferroni; **Fig. 7h**). In contrast, when *Hdh^{ex4-5}* cells overexpressed any of the N-terminal htt from ancient and more evolved species, they were significantly protected from apoptosis induced by serum deprivation ($P < 0.0001$, one-way ANOVA with post-test Bonferroni). The extent of rescue was similar among cells that expressed different htt orthologs; this suggests that htt's anti-apoptotic activity is an ancestral function that appeared in *D. discoideum* and was maintained in *H. sapiens* and *D. melanogaster*. In conclusion, our results indicate that htt possesses two functions that are embedded in its N terminus: the prevention of apoptosis, which is present in ancestral genes, and the control of cell-cell contacts between neuroepithelial cells, which is an evolutionarily more recent acquisition.

DISCUSSION

Taking advantage of an ES cell-based neural differentiation protocol²⁶, we found that htt is involved in homotypic interactions between neuroepithelial cells by regulating a critical cell-cell adhesion pathway involving ADAM10 and Ncadherin activities. The ablation of Ncadherin in mouse and zebrafish embryos causes a defect in neural tube formation^{31,37}. We found that blocking htt transcript in zebrafish embryos resulted in impaired Ncadherin-mediated cell-cell interactions and impaired expression and distribution of the apical marker ZO-1, which in turn result in cell dispersion and cellular aggregates in the brain ventricles during development. Notably, we found that, in htt loss-of-function embryos and Ncadherin mutants, the loss of neural tube organization was restricted to alar regions, whereas cells in the basal positions remain correctly organized³⁷. These data support the notion that neurulation defects in the htt knockdown zebrafish

ARTICLES

embryos depend on impairment in Ncadherin-mediated cell adhesion. We observed a similar cell-cell interaction defect, which we termed rosetteless, in htt-null ES cells that were undergoing neurulation. This defect was rescued by the expression of an Ncadherin mutant that lacked the ADAM10 cleavage site or with transfection of ADAM10 siRNA. Similarly, inhibition of ADAM10 activity by pharmacological treatment *in vivo* improved the overall morphology and brain ventricle shape of htt loss-of-function zebrafish embryos. Furthermore, our results suggest a mechanistic model in which wild-type htt controls cell-adhesion functions by recruiting ADAM10 in the cell cytoplasm, thereby regulating the formation of the ADAM10-SAP97 complex that drives Ncadherin cleavage. ADAM10 is responsible for the shedding of several cell surface proteins in addition to Ncadherin. Ephrins, amyloid precursor protein and Notch are some of the growing list of ADAM10 substrates that are involved in brain development^{41,42}. It is possible that htt may regulate the activity of other ADAM10 substrates.

We also found that htt's control of neural cell adhesion is an evolutionarily recent acquisition in deuterostomes and is associated with the N terminus of the protein. This function was subtle in lower deuterostomes and then appeared in the cephalochordate *B. floridae*, the first organism to exhibit cephalization, and increased in fishes and mammals. It is highly likely that, beyond cell adhesion, additional htt activities and molecular pathways could emerge during evolution to further reinforce htt's role during neurulation in mammals. Furthermore, *D. melanogaster* htt did not exhibit this cell-adhesion function, which suggests that htt's neural function in *D. melanogaster* may be fundamentally different or limited. Accordingly, the *D. melanogaster* htt sequence is quite divergent from mammalian htt^{2,43} and, in contrast with observations in mice, the htt knockout flies showed no obvious developmental defects⁴⁴. We also found that the N-terminal domain of htt confers cell-adhesion activities that are essential for neurulation. Notably, all eight of the heterologous N-terminal htt constructs that we tested were equally capable of reverting apoptosis in self-renewing htt-null ES cells exposed to serum deprivation. We propose that the anti-apoptotic activity of htt may represent one of htt's ancestral function(s). htt's ability to control mitotic spindle orientation was also acquired early in evolution and is conserved in *D. melanogaster*²². However, we found that, later in deuterostome evolution, htt acquired a more specific neural cell-adhesion regulation activity, with implications for brain development in vertebrates.

We also found increased ADAM10 activity and Ncadherin cleavage in htt-deficient adult brain, which suggests that htt may control cell-cell adhesion in the mature brain, perhaps to promote neuronal plasticity or synapse remodeling. An increase in the activity of other matrix metalloproteinases has been seen in the brains of individuals afflicted with Huntington's disease⁴⁵. ADAM10 and Ncadherin were previously implicated in spine maturation³⁵; increased ADAM10 activity was associated with protection from neurodegeneration in mouse models of Alzheimer Disease^{46,47}; and total Ncadherin levels were reduced in cellular and mouse model of Huntington's disease⁴⁸. Our findings reveal a previously unknown function for htt during neurulation and suggest that the progressive increase in the length of its CAG repeat sequence in deuterostomes may be implicated in the evolutionary path that has led to the acquisition of morphological complex nervous systems. Our findings indicate that evolutionary principles can be experimentally tested and suggest ADAM10 as a new target in the treatment of Huntington's disease.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. MacDonald (Massachusetts General Hospital) for the *Hdh*^{+/+} and *Hdh*^{ex4-5} cells, P. Saftig for the ADAM10 antibody (University of Kiel), E. Ruthazer for the zebrafish Ncadherin antibody (McGill University), F. Gardoni and E. Marcelllo for helpful technical advice on the use of ADAM10 and SAP97 antibodies, A. Badaloni for help with subcloning, and G. Simonutti for assistance with initial imaging analysis. This work has progressed at a very slow pace because it was mostly unfunded. In the beginning, this work was partially supported by the Huntington's Disease Society of America Coalition for the Cure (2007–2009) and by Italian Telethon Foundation (GPP06250, 2007–2009). Some additional support was provided by the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca Scientifica, Programmi di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale (2006052993, 2006). Since 2009, progress of this work has relied entirely on occasional donations. We wish to thank one donor that in 2009 collected a considerable amount of small donations for us to continue this work and another donor that has been following our progress for 10 years. C.R. was supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (grant number SFRH/BD/9627/2002) through the GABBA Programme (University of Porto). E.C., I.G. and S.Z. were members of the Huntington's Disease Society of America Coalition for the Cure and I.G. received support from NS16367.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.C., V.L.S. and C.Z. developed the study, conceived the experimental plans and analyzed the data. V.L.S. and C.Z. performed most of the biological, biochemical and molecular experiments. B.V. performed some of the biological and biochemical experiments. M.T. and C.R. participated in the initial elaboration of the project and conducted some experiments (some of the initial constructs preparation and monolayer assays, respectively). V.L.S. prepared additional constructs. M.A.M., I.A.W. and I.G. provided the *Dictyostelium* and *Drosophila* cDNA. G.G., C.Z. and A.P. performed experiments in zebrafish under the supervision of E.C. (immunocytochemistry and *in situ* were performed by G.G. and A.P., biochemical assays by C.Z.). M.V. and L.C. provided suggestions for some biological experiments. S.Z. provided the conditional knockout mice and some constructs. B.D. and B.S. provided G1254023X. V.L.S., C.Z. and E.C. interpreted the data and wrote the manuscript. All of the authors read and edited the manuscript. E.C. supervised the entire work, directed the strategies, provided financial support and gave final approval of the version to be published.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- MacDonald, M.E. *et al.* A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971–983 (1993).
- Tartari, M. *et al.* Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 330–338 (2008).
- Palidwor, G.A. *et al.* Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000304 (2009).
- Myre, M.A. *et al.* Deficiency of huntingtin has pleiotropic effects in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *PLoS Genet.* **7**, e1002052 (2011).
- Bhide, P.G. *et al.* Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *J. Neurosci.* **16**, 5523–5535 (1996).
- Zuccato, C., Valenza, M. & Cattaneo, E. Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* **90**, 905–981 (2010).
- O'Kusky, J.R., Nasir, J., Cicchetti, F., Parent, A. & Hayden, M.R. Neuronal degeneration in the basal ganglia and loss of pallido-subthalamic synapses in mice with targeted disruption of the Huntington's disease gene. *Brain Res.* **818**, 468–479 (1999).
- Dragatsis, I., Levine, M.S. & Zeitlin, S. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* **26**, 300–306 (2000).
- Zhang, Y. *et al.* Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. *J. Neurochem.* **87**, 101–106 (2003).
- Leavitt, B.R. *et al.* Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J. Neurochem.* **96**, 1121–1129 (2006).
- Rigamonti, D. *et al.* Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J. Neurosci.* **20**, 3705–3713 (2000).
- Rigamonti, D. *et al.* Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J. Biol. Chem.* **276**, 14545–14548 (2001).

13. Ho, L.W., Brown, R., Maxwell, M., Wyttenbach, A. & Rubinstein, D.C. Wild-type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *J. Med. Genet.* **38**, 450–452 (2001).
14. Duyao, M.P. *et al.* Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog *Hdh*. *Science* **269**, 407–410 (1995).
15. Nasir, J. *et al.* Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**, 811–823 (1995).
16. Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E. & Erstradiadis, A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* **11**, 155–163 (1995).
17. Dragatsis, I., Erstradiadis, A. & Zeitlin, S. Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development* **125**, 1529–1539 (1998).
18. White, J.K. *et al.* Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat. Genet.* **17**, 404–410 (1997).
19. Auerbach, W. *et al.* The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2515–2523 (2001).
20. Henshall, T.L. *et al.* Selective neuronal requirement for huntingtin in the developing zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4830–4842 (2009).
21. Reiner, A. *et al.* Neurons lacking huntingtin differentially colonize brain and survive in chimeric mice. *J. Neurosci.* **21**, 7608–7619 (2001).
22. Godin, J.D. *et al.* Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* **67**, 392–406 (2010).
23. Abranches, E. *et al.* Neural differentiation of embryonic stem cells *in vitro*: a road map to neurogenesis in the embryo. *PLoS ONE* **4**, e6286 (2009).
24. Elkabetz, Y. *et al.* Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* **22**, 152–165 (2008).
25. Hoettecke, N., Ludwig, A., Foro, S. & Schmidt, B. Improved synthesis of ADAM10 inhibitor GI254023X. *Neurodegener. Dis.* **7**, 232–238 (2010).
26. Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. & Smith, A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* **21**, 183–186 (2003).
27. Diekmann, H. *et al.* Decreased BDNF levels are a major contributor to the embryonic phenotype of huntingtin knockdown zebrafish. *J. Neurosci.* **29**, 1343–1349 (2009).
28. Kelly, G.M. & Moon, R.T. Involvement of *wnt1* and *pax2* in the formation of the midbrain–hindbrain boundary in the zebrafish gastrula. *Dev. Genet.* **17**, 129–140 (1995).
29. Adolf, B., Bellipanni, G., Huber, V. & Bally-Cuif, L. *atoh1.2* and *beta3.1* are two new bHLH-encoding genes expressed in selective precursor cells of the zebrafish anterior hindbrain. *Gene Expr. Patterns* **5**, 35–41 (2004).
30. Halbleib, J.M. & Nelson, W.J. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* **20**, 3199–3214 (2006).
31. Radice, G.L. *et al.* Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev. Biol.* **181**, 64–78 (1997).
32. Reiss, K. *et al.* ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signaling. *EMBO J.* **24**, 742–752 (2005).
33. Marambaud, P. *et al.* A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* **21**, 1948–1956 (2002).
34. Marcello, E. *et al.* Synapse-associated protein 97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J. Neurosci.* **27**, 1682–1691 (2007).
35. Malinverno, M. *et al.* Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J. Neurosci.* **30**, 16343–16355 (2010).
36. Uemura, K. *et al.* Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci. Lett.* **402**, 278–283 (2006).
37. Lele, Z. *et al.* Parachute/n-cadherin is required for morphogenesis and maintained integrity of the zebrafish neural tube. *Development* **129**, 3281–3294 (2002).
38. Inoshima, I. *et al.* A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat. Med.* **17**, 1310–1314 (2011).
39. Chen, Y.Y., Hehr, C.L., Atkinson-Leadbetter, K., Hocking, J.C. & McFarlane, S. Targeting of retinal axons requires the metalloproteinase ADAM10. *J. Neurosci.* **27**, 8448–8456 (2007).
40. Zhang, Y. *et al.* Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J.* **25**, 5896–5906 (2006).
41. Yang, P., Baker, K.A. & Hagg, T. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog. Neurobiol.* **79**, 73–94 (2006).
42. Muraguchi, T. *et al.* RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat. Neurosci.* **10**, 838–845 (2007).
43. Li, Z., Karlovich, C.A., Fish, M.P., Scott, M.P. & Myers, R.M. A putative *Drosophila* homolog of the Huntington's disease gene. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1807–1815 (1999).
44. Zhang, S., Feany, M.B., Saraswati, S., Littleton, J.T. & Perrimon, N. Inactivation of *Drosophila* Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Dis. Model Mech.* **2**, 247–266 (2009).
45. Miller, J.P. *et al.* Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* **67**, 199–212 (2010).
46. Postina, R. *et al.* A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* **113**, 1456–1464 (2004).
47. Prinzen, C. *et al.* Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC Genomics* **10**, 66 (2009).
48. Reis, S.A. *et al.* Striatal neurons expressing full-length mutant huntingtin exhibit decreased N-cadherin and altered neurogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2344–2355 (2011).



ONLINE METHODS

Cell lines. We used mouse ES cell lines expressing either the wild-type huntingtin gene (*Hdh*^{+/+} and *Hdh*^{+/+}, two different batches of *Hdh*^{+/+} ES cells) or carrying a homozygous knockout of the *Hdh* gene (*Hdh*^{ex4-5}), in which both alleles of the *Hdh* gene were inactivated by deletion of exons 4 and 5 (ref. 14); *Hdh*^{pr-ex1}, derived by deleting the promoter and exon 1 of the *Hdh* gene¹⁶).

Mouse ES cell culture. ES cells were maintained in Glasgow minimal essential medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (vol/vol, EuroClone), 1 mM β -mercaptoethanol, 100 μ M non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate (Gibco), 2 mM L-glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin (EuroClone) and 1,000 U ml⁻¹ murine leukemia inhibitor factor (LIF, ESGRO) (Chemicon) in gelatinized tissue culture flasks. Cells were passaged every 2 d after dissociation with 0.05% trypsin-EDTA (vol/vol).

Mouse ES cell monolayer differentiation. ES cells were dissociated and plated onto 0.1% gelatin-coated tissue culture dishes at a density of $1-1.5 \times 10^4$ cells per cm² in N2B27 medium. Medium was renewed every 2 d. N2B27 medium was a 1:1 mixture of DMEM/F12 supplemented with N2 and Neurobasal medium supplemented with B27 (Gibco). After day 9, N2B27 cell culture medium was a 1:4 mixture of the same supplemented media.

Zebrafish lines and maintenance. Current Italian national rules: no approval needs to be given for research on zebrafish embryos. Wild-type zebrafish of the AB strain were maintained at 28 °C on a 14-h light/10-h dark cycle at the Department of Biology, Università degli Studi di Milano, according to ref. 49. Embryos were collected by natural spawning, staged and raised at 28 °C in fish water (Instant Ocean, 0.1% methylene blue, vol/vol) in Petri dishes.

htt morpholino. htt morpholino (Gene Tools) was designed to specifically target the zebrafish htt translation initiation codon (htt ATG MO, 5'-GCCATTTTAAACA GAAGCTGTGATGA-3')²⁷. Injections were carried out on 1-2 cell-stage embryos (Eppendorf FemtoJet Micromanipulator 5171); the dye tracer, rhodamine dextran, was co-injected. A standard control morpholino oligonucleotide specific for human β -thalassaemia was used.

Zebrafish histology and brain ventricle imaging. Embryos were anaesthetized in 0.1 mg ml⁻¹ tricaine (Sigma) in embryo medium. Hindbrain ventricle micro-injection was performed with 2-10 nl of dextran conjugated to rhodamine (5% in 0.2 mol l⁻¹ KCl, vol/vol, Sigma). For histological sections, morphant and control embryos were fixed in Bouin's solution or 4% paraformaldehyde (vol/vol), dehydrated, paraffin embedded and sectioned (6-8 μ m). The images were acquired with a Leica DM6000 B microscope equipped with LAS Leica imaging software (Leica).

Mouse tissues. We analyzed total brain tissues from mice (two mice per genotype), aged 1.75 months, with the conditional *Hdh* mutation, *Nestin-cre/+*; *Hdh*^{loxP/-}.

DNA transfections. *Hdh*^{ex4-5} ES cells were plated at a density of $1-1.5 \times 10^4$ cells per cm². After 24 h, cells were transfected with different expression vectors (4 μ g) and Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were selected with puromycin (2 μ g ml⁻¹) 24 h after lipofection for 15 d. Cells were lysed and reverse-transcription PCR, western blot and immunofluorescence were performed to determine the presence of the transgene. The same protocol was used for transient transfection experiments during monolayer protocol (day 2, 3 and 4).

Constructs. The N-terminal and C-terminal portion of htt were designed according to htt protein multialignment² and cloned in pCAG constructs: pCAG-*D. discoideum*-N569-HA, pCAG-*S. purpuratus*-N519-HA, pCAG-*C. intestinalis*-N409-HA, pCAG-*B. floridae*-N478-HA, pCAG-*D. rerio*-N517-HA, pCAG-*M. musculus*-N548, pCAG-*M. musculus*-N548-HA, pCAG-*H. sapiens*-N652-15Q, pCAG-*M. musculus*-C-650-HA, pCAG-*D. melanogaster*-N548-HA. For full-length htt transfection, we used the 3xFLAG-7Q full-length mouse produced by S.Z. The Naccharin cleavage-defective plasmid (*cdh2-GD-HA*) was created by site-directed mutagenesis as described previously²⁶.

siRNA transfection. 100 nM htt siRNA and scrambled siRNA from Dharmacon were transfected into R1 ES cells (*Hdh*^{+/+}) with the Amaxa mouse ES cell nucleofactor kit (A-24 program). 100 pmol ADAM10 siRNA and scrambled siRNA from Invitrogen was transfected into *Hdh*^{ex4-5} ES cells with Lipofectamine 2000. After 24 h, transfected cells were plated for neural differentiation²⁶. During monolayer differentiation cells were transfected at day 2, 3 and 4 with 600 pmol htt siRNA and Lipofectamine 2000. RNA was collected from transfected cells 48 h post transfection and the analysis of *Hdh* mRNA knockdown was performed by real-time PCR.

Pharmacological treatments. On day 8 of neural differentiation, *Hdh*^{ex4-5} and wild-type cells were incubated for 1 h with 34 μ M TIMP1 (in phosphate-buffered saline, PBS).

GI254023X treatment of zebrafish embryos. We prepared 100 mM stock solution by dissolving GI254023X²⁵ in DMSO. Stock solutions were diluted in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) to final concentration of 40 μ M. Embryos at 80% epiboly were dechorionated to allow access to the compound and were incubated in 2.5 ml compound dilutions or control medium (DMSO final concentration was 0.04%, vol/vol) in 12-well plates for 24 h. ADAM10 sequences analysis was performed by means of NCBI and Ensembl databases and related tools.

Immunofluorescence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at 20-23 °C. Cells were permeabilized in PBS with 0.5% Triton X-100 (vol/vol) and blocked with 5% fetal calf serum (vol/vol) for 1 h. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4 °C. After three washes in PBS, appropriate secondary antibodies, conjugated to Alexa fluorophores 488 or 568 (Molecular Probes, Invitrogen) and diluted 1:500 in blocking solution, were applied for 1 h at 20-23 °C. Cells were incubated for 10 min with Hoechst 33258 (5 μ g ml⁻¹, Molecular Probes, Invitrogen). Images were acquired with a Leica DMI 6000B microscope (equipped with LAS-AF imaging software) and processed with Adobe Photoshop and ImageJ (US National Institutes of Health) software.

Rosettes quantification. Rosettes were quantified in cell cultures on day 8 of neural differentiation after staining for Nestin. Ten images of random fields for each cell line were acquired. Each experiment was independently repeated at least three times. ImageJ analysis software was applied to calculate the area occupied by Nestin⁺ cells as the total for normalization of each field. The shape of each rosette was outlined and the area occupied by Nestin staining was taken as area occupied by Nestin⁺ cells inside rosettes. The remaining Nestin signal was taken as the area occupied by Nestin⁺ cells outside rosettes. Data in graphs indicate the percentage of area occupied by Nestin⁺ cells inside and outside of rosettes.

Protein lysates and western blot. Cells and mouse brain tissue were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, wt/vol) with 1 mM PMSE, 1 mM DTT, and protease inhibitor (Sigma). Lysates were cleared by centrifugation for 30 min at 12,000g at 4 °C. The resulting supernatant was collected. Protein concentration was determined with the BCA assay (Pierce) and 30-60 μ g were loaded on a 10% SDS-PAGE gel. Separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane, blocked with 5% nonfat dry milk (wt/vol, Biorad) in Tris-buffered saline (TBS) and 0.1% Tween-20 (vol/vol), and incubated with primary antibodies at 20-23 °C for 2 h. After washing, filters were incubated for 1 h at 20-23 °C with a secondary antibody (peroxidase conjugate, Biorad, 1:3,000) and then washed three times with TBS and 0.1% Tween-20. The SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) was used to visualize immunoreactive bands by exposure to Amersham ECL Hyperfilm (GE Healthcare).

Co-immunoprecipitation. For ADAM10 and htt immunoprecipitation, we prepared total protein extracts as previously described. We precleared 500 μ g protein homogenate in a final volume of 300 μ l with 1/10 volume of Protein G-sepharose beads (GE Healthcare) after rocking for 1 h at 4 °C. The precleared supernatants were incubated with 3 μ g of antibody to ADAM10 (Abcam) or 5 μ g of antibody to htt (Mab2166 Millipore) overnight at 4 °C. Protein G-sepharose



beads were added and incubation was continued for 3 h, at 4 °C, with shaking. The beads were washed three times with RIPA buffer. Sample buffer for SDS-PAGE was added, and the mixture was heated for 10 min. Beads were collected by centrifugation and a volume of supernatant was applied onto 10% SDS-PAGE. ADAM10 immunocomplex precipitation was revealed by monoclonal antibody to SAP97 (Enzo Life Sciences) and huntingtin immunocomplex precipitation was revealed by polyclonal antibody to ADAM10 (kindly provided by P. Saftig).

In situ hybridization and immunohistochemistry of zebrafish embryos. Whole-mount *in situ* hybridization was carried out as described previously⁵⁰ on embryos fixed for 2 h in 4% paraformaldehyde in PBS, then rinsed with PBS-Tween, dehydrated in 100% methanol and stored at -20 °C until processed⁵¹. For ZO-1 immunohistochemistry, embryos were exposed to ZO-1 primary antibody (Zymed, 1:300), then treated with a biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories). Digital images of all embryos were captured using a digital camera (Leica).

Zebrafish western blots. Ncadherin western blots were prepared with 30 dechorionated and deyolked embryos (24 hpf) lysed in 100 µl of RIPA buffer with 1 mM PMSF and protease inhibitors. Samples were sonicated four times with 15-s pulses (micropulse at 40–50% output and 70% duty cycle). SDS sample buffer was added to the samples, and proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane at 90 mA overnight. The membrane was blocked and incubated overnight as described above with an antibody to the pro-domain of zebrafish Ncadherin (kindly provided by E. Ruthazer), diluted 1:5,000. After four 15-min washes in blocking solution, the membrane was incubated for 1 h with secondary antibody to rabbit (peroxidase conjugate, Bio-Rad, 1:5,000) prepared in 5% nonfat dry milk in TBS and 0.3% Tween-20. The membrane was then washed three times in TBS and 0.3% Tween-20 before detection by chemiluminescence with SuperSignal West Femto Substrate (Pierce).

Antibodies. The antibodies and dilutions used for immunofluorescence or immunohistochemistry (IHC) and western blotting were: monoclonal antibody to HA (Covance; immunofluorescence, 1:500; western blotting, 1:1,000), monoclonal antibody to huntingtin (Mab2166, Millipore; immunofluorescence, 1:800; western blotting, 1:2,000), monoclonal antibody to MAP2 (Becton Dickinson; immunofluorescence, 1:1,000), monoclonal antibody to Ncadherin (Becton Dickinson; immunofluorescence, 1:1,000; western blotting, 1:4,000), monoclonal antibody to Nestin (Millipore; immunofluorescence, 1:200), monoclonal antibody to α -tubulin (Sigma; western blotting, 1:3,000), polyclonal antibody to ADAM10 (kindly provided by P. Saftig; western blotting, 1:1,000); polyclonal antibody to Ncadherin (zebrafish) (kindly provided from E. Ruthazer), monoclonal antibody to SAP97 (Enzo Life Sciences; western blotting, 1:1,000); polyclonal antibody to GFAP (Dako; immunofluorescence, 1:1,000), polyclonal antibody to ZO1 (Zymed; IHC, 1:50), polyclonal antibody to GAP43

(Chemicon; immunofluorescence, 1:500), polyclonal antibody to β -3 tubulin (Covance; immunofluorescence, 1:1,000) and polyclonal antibody to Sox1 (Santa Cruz; immunofluorescence, 1:100).

RNA extraction and reverse transcription. Total RNA was extracted with the Trizol reagent (Invitrogen). Total RNA concentration was measured with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). For mRNA detection, 1,000 ng of total RNA was reverse-transcribed to single-stranded cDNA with Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) and 250 ng of random primers.

Real-time PCR. We used an iCycler Thermal Cycler with a Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). All reactions were performed in a total volume of 25 µl with 5 µl of cDNA, 20 µl iQTM SYBR Green Supermix-Bio-Rad, and 0.2 µM each of forward and reverse primers. The amplification consisted of 95 °C for 3 min, and 45 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. Fluorescence was quantified during the annealing step and product formation was confirmed by melting curve analysis (55–94 °C). We used primers for *Adam10* (forward, GGAAGCTTTAGTCATGGGTCTG; reverse, CTCCTTCCTCTACTCCAGTCATT; annealing 60 °C), *Cdh2* (forward, AACACAGCCACAGCCGTCATC; reverse, CTTTGTCCGTGACAGTTAGGTGT; annealing 60 °C), *Sap97* (also known as *Dlg1*; forward, GTGTGCCGCTTCCTGATTCTG; reverse, CCCGCTCTATGGAACCTTCTGAG) and *Hdh* (forward, CGCTATGGAAGTGTCTGCTGTG; reverse, CTGTAGCCTTGAAGATTAGAATCCATCT; annealing 60 °C).

Apo-tox Glo triplex Assay. Cells were seeded in triplicate in a 96-well plate, at 5×10^3 cells per well. After an 8-h incubation at 37 °C, cells received 100 µl of freshly prepared GMEM+LIF without serum. At 24 h after plating, 20 µl of viability reagent was added to all wells. After 1 h of incubation at 37 °C, fluorescence was measured at 400Ex/505Em with a Synergy HT multi-detection microplate reader (BioTek). Caspase-Glo 3/7 Reagent (100 µl) was added to all wells. After 30 min of incubation at 20–23 °C, luminescence was recorded with a Veritas-Microplate Luminometer (Turner Biosystems). Each experiment was independently repeated at least three times. Results are presented as the ratio of luminescence/fluorescence recorded for each cell line.

Statistical analyses. Two-tailed unpaired *t* test or one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test were used. *P* values, s.d., s.e.m. and mean values were calculated using GraphPad Prism version 4.0.

49. Westerfield, M. *The Zebrafish Book* (University of Oregon Press, 1993).

50. Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T.F. & Postlethwait, J.H. Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* **119**, 1203–1215 (1993).

51. Jowett, T. & Lettice, L. Whole-mount *in situ* hybridizations on zebrafish embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labeled probes. *Trends Genet.* **10**, 73–74 (1994).

3.4. Lösliches CD23 kontrolliert die Immunoglobulin E Synthese und Homöostase in humanen B-Zellen

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht [Copyright 2012. The American Association of Immunologists, Inc.]:²⁹⁰

Autoren: Alison M. Cooper, Philip S. Hobsen, Mark R. Jutton, Michael W. Kao, Binia Drung, Boris Schmidt, David J. Fear, Andrew J. Beavil, James M. McDonnell, Brian J. Sutton, Hannah J. Gould.

Titel: „Soluble CD23 Controls IgE Synthesis and Homeostasis in Human B Cells“.

Journal: The Journal of Immunology, **2012**, 188, 7, 3199-3207.

DOI: 10.4049/jimmunol.1102689.

Mit freundlicher Genehmigung von der American Association of Immunologists, Inc.

Zusammenfassung:

CD23 ist ein niedrig affiner Rezeptor für Immunoglobulin E (IgE), welcher sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vorliegen kann. ADAM10 trennt die löslichen CD23 (sCD23) Fragmente von membrangebundenen CD23 (mCD23) ab.

Es ist bekannt, dass mCD23 die IgE-Synthese negativ reguliert. Zusätzlich offenbart eine klinische Studie mCD23 als potentiell Target für die Therapie von chronischen Asthma-Patienten. Allerdings ist für die Entwicklung besserer therapeutischer Strategien ein höheres Verständnis der regulierenden Vorgänge notwendig, weshalb in der vorliegenden Veröffentlichung die Funktion von sCD23 untersucht wurde.

In vitro wurden humane B-Zellen aus den Tonsillen durch Inkubation mit IL-4 und anti-CD40 zur Bildung von IgE stimuliert. Eine Korrelation der Bildung von sCD23 zu der Konzentration an freigesetzten IgE konnte durch Hemmung der CD23-Bildung mit *small interfering RNA* (siRNA) demonstriert werden.

Um weitere beeinflussende Faktoren auszuschließen, die durch die Transfektion mit siRNA hervorgerufen werden könnten, wurde der ADAM10-Inhibitor GI254023X **91** eingesetzt. Dieser verhindert die Spaltung von mCD23 zu sCD23 durch Hemmung von ADAM10. Die Applikation dieses Inhibitors reduzierte die sCD23-Bildung und IgE Absonderung deutlich, wobei die Menge an freigesetzten IgE mit der Konzentration von GI254023X **91** korreliert.

Die natürlichen Proteinbeschaffenheiten sollten unter möglichst realen Bedingungen untersucht werden, wofür ein nicht natürlich vorkommendes trimeres sCD23 (triCD23) hergestellt wurde. Dieses soll den trimeren Zustand von CD23 bei der Spaltung von der

Membran simulieren. Nach 12 Tagen Einwirkung des triCD23 konnte ein Anstieg von freien IgE um bis zu 200 % beobachtet werden, wohingegen Zellen, die mit monomeren sCD23 kultiviert worden waren, im Vergleich zu Kontrollproben weniger IgE produzierten.

Diese durch triCD23 induzierte Zunahme an IgE konnte auch bei Anwesenheit von GI254023X **91** und somit Inhibition der mCD23-Spaltung beobachtet werden, woraus auf eine durch sCD23 kontrollierte IgE-Synthese geschlossen werden kann.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass das zugefügte rekombinante triCD23 an B-Zellen bindet, die membrangebundenes IgE (mIgE) und mCD21 zusammen exprimieren und diese auf der Zellmembran bedeckt. Eine Analyse der IgE-Freisetzung unter Verwendung von anti-CD21 deuten auf eine Kooperation von mIgE und mCD21 in der durch sCD23 regulierten IgE-Synthese hin. Eine rückgekoppelte Regulation könnte erfolgen, wenn die Konzentration von freien IgE hoch genug wird um an mCD23 zu binden und hierdurch die weitere Abspaltung von sCD23 verhindert wird.

Insgesamt konnte eine regulierende Wirkung von sCD23 auf die IgE-Synthese herausgestellt werden. sCD23 ist daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zur Behandlung von allergischen Erkrankungen.

Synthetischer Beitrag zur Arbeit: GI254023X **91** (+ siehe Kapitel 3.3.1).



This information is current as
of October 31, 2013.

Soluble CD23 Controls IgE Synthesis and Homeostasis in Human B Cells

Alison M. Cooper, Philip S. Hobson, Mark R. Jutton,
Michael W. Kao, Binia Drung, Boris Schmidt, David J. Fear,
Andrew J. Beavil, James M. McDonnell, Brian J. Sutton and
Hannah J. Gould

J Immunol 2012; 188:3199-3207; Prepublished online 5
March 2012;
doi: 10.4049/jimmunol.1102689
<http://www.jimmunol.org/content/188/7/3199>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2012/03/05/jimmunol.1102689.DC1.html>

References This article **cites 51 articles**, 19 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/188/7/3199.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2012 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Soluble CD23 Controls IgE Synthesis and Homeostasis in Human B Cells

Alison M. Cooper,^{*,†} Philip S. Hobson,^{*,†} Mark R. Jutton,^{†,1} Michael W. Kao,^{*,†}
Binia Drung,[‡] Boris Schmidt,[‡] David J. Fear,^{*,§} Andrew J. Beavil,^{*,†} James M. McDonnell,^{*,†}
Brian J. Sutton,^{*,†} and Hannah J. Gould^{*,†}

CD23, the low-affinity receptor for IgE, exists in membrane and soluble forms. Soluble CD23 (sCD23) fragments are released from membrane (m)CD23 by the endogenous metalloprotease a disintegrin and metalloprotease 10. When purified tonsil B cells are incubated with IL-4 and anti-CD40 to induce class switching to IgE in vitro, mCD23 is upregulated, and sCD23 accumulates in the medium prior to IgE synthesis. We have uncoupled the effects of mCD23 cleavage and accumulation of sCD23 on IgE synthesis in this system. We show that small interfering RNA inhibition of CD23 synthesis or inhibition of mCD23 cleavage by an a disintegrin and metalloprotease 10 inhibitor, GI254023X, suppresses IL-4 and anti-CD40-stimulated IgE synthesis. Addition of a recombinant trimeric sCD23 enhances IgE synthesis in this system. This occurs even when endogenous mCD23 is protected from cleavage by GI254023X, indicating that IgE synthesis is positively controlled by sCD23. We show that recombinant trimeric sCD23 binds to cells coexpressing mIgE and mCD21 and caps these proteins on the B cell membrane. Upregulation of IgE by sCD23 occurs after class-switch recombination, and its effects are isotype-specific. These results suggest that mIgE and mCD21 cooperate in the sCD23-mediated positive regulation of IgE synthesis on cells committed to IgE synthesis. Feedback regulation may occur when the concentration of secreted IgE becomes great enough to allow binding to mCD23, thus preventing further release of sCD23. We interpret these results with the aid of a model for the upregulation of IgE by sCD23. *The Journal of Immunology*, 2012, 188: 3199–3207.

CD23 is the low-affinity receptor for IgE on B cells. It is initially expressed as a 45-kDa type II membrane protein (membrane [m]CD23) containing a lectin head domain, harboring the IgE binding site, and a C-terminal tail in the extracellular sequence (1, 2). CD23 is assembled into a trimer (3), the predominant form in the B cell membrane, by way of an

α -helical coiled-coil stalk that links the three lectin head and tail domains to their transmembrane and cytoplasmic sequences (4). CD23 is expressed in two forms, CD23a and CD23b, resulting from alternative transcription initiation sites and differing only by six or seven amino acids in the intracellular N-terminal cytoplasmic sequence (5). CD23a is expressed on Ag-activated B cells, whereas CD23b expression is upregulated by IL-4 in allergic inflammation and is associated with elevated serum IgE (6–8). The anti-CD23 mAb lumiliximab downregulates IgE synthesis by human B cells in vitro (9) and reduced human serum IgE levels in a phase I clinical trial in patients with mild to moderate persistent allergic asthma (10, 11). This provides proof of principle that mCD23 is a valid target for therapy. Understanding the regulation of CD23 has the potential to inspire a more cost-effective interventional strategy.

It has long been known that CD23 negatively regulates the synthesis of IgE (12, 13). The most compelling evidence comes from CD23 knockout mice, which exhibit greatly increased levels of Ag-specific IgE after immunization (12, 13). IgE synthesis is also inhibited in human B cells by anti-CD23 Abs (9, 14, 15) or Ag–IgE complexes that bind to mCD23 (16). Neither free IgE nor Ab Fab fragments have this inhibitory activity, suggesting that cross-linking of mCD23 is required for the inhibition (15). These observations suggest that mCD23 may act in a negative-feedback mechanism on IgE synthesis.

mCD23 can be cleaved in the stalk region by the endogenous a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) to release a 37-kDa soluble fragment (soluble [s]CD23) both in vitro (17, 18) and in vivo (18–20). After the initial cleavage by ADAM10, sCD23 is susceptible to further cleavage by other proteases into fragments of various sizes (33, 29, 25, and 16 kDa), eliminating additional parts of the stalk and tail. These fragments lose the ability to independently form trimers but retain the ability to bind IgE, albeit at lower affinity (3). The 16-kDa fragment, termed derCD23, containing only the

^{*}Medical Research Council and Asthma UK Centre in Allergic Mechanisms of Asthma, King's College London, Guy's Hospital, London SE1 9RT, United Kingdom; [†]Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London, London SE1 1UL, United Kingdom; [‡]Clemens Schöpf Institute of Chemistry and Biochemistry, Technical University of Darmstadt, Darmstadt 64289, Germany; and [§]Division of Asthma, Allergy and Lung Biology, King's College London, Guy's Hospital, London SE1 9RT, United Kingdom

¹Current address: Sudler & Hennessey, Milan, Italy.

Received for publication September 16, 2011. Accepted for publication January 25, 2012.

This work was supported by Wellcome Trust Programme Grant 076343 and the U.K. Department of Health via the National Institute for Health Research Comprehensive Biomedical Research Centre award to Guy's and St. Thomas' National Health Service Foundation Trust in partnership with King's College London. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. A.M.C. is a Medical Research Council (MRC) and Asthma UK-funded Ph.D. student as part of the MRC and Asthma UK Centre for Allergic Mechanisms of Asthma. M.R.J. was funded by a MRC Collaborative Award in Science and Engineering Ph.D. studentship with Novartis.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Hannah J. Gould, Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London, Room 3.6B, New Hunt's House, Guy's Campus, London SE1 1UL, U.K. E-mail address: hannah.gould@kcl.ac.uk

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ADAM10, a disintegrin and metalloprotease 10; CSR, class-switch recombination; Ct, threshold cycle; derCD23, 16-kDa fragment of soluble CD23 resulting from cleavage by group I allergen of *Dermatophagoides pteromyssinus*; eGFP, e green fluorescent protein; m, membrane; MFI, mean fluorescence intensity; qPCR, quantitative PCR; s, soluble; sIgE, secreted IgE; siRNA, small interfering RNA; trCD23, recombinant trimeric soluble CD23.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102689

lectin domain and 10 aa of the tail, results from cleavage by the house dust mite allergen, group I allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus* (21, 22). Whether sCD23, resulting from mCD23 cleavage, is involved in the positive regulation of IgE synthesis is not as clear as the negative regulation by mCD23. A number of studies have shown that sCD23 fragments either up- or down-regulate IgE synthesis in human B cells (23, 24), depending on their size and ability to form trimers (9, 25, 26). The use of selective ADAM10 inhibitors is considered a potential therapy for asthma, based on a recent preclinical trial in mice (19). Thus, sCD23, as well as mCD23, may be promising targets for therapy.

Human CD23 binds not only to IgE, but also to CD21 (CR2) (24), CD11b (CR3), CD11c (CR4) (27), the vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) (28), and potentially other, as yet unidentified, proteins. However, IgE and CD21 are the only known ligands on mature B cells, with both binding sites distinct from each other and from the interface between the head domains in the CD23 trimer (29). Prior to the discovery of CD21 as the counterreceptor for CD23 on B cells (24, 30), CD21 was already well characterized as the receptor for the C3d fragments of complement that play an important role in the complement cascade and adaptive immunity (31, 32). In human CD23, the binding site for CD21 resides in the C-terminal tail (29). This tail is not present in murine CD23 (33), which may explain why sCD23 expressed in transgenic mice does not upregulate IgE during immunization, leaving only downregulation through mCD23 (13, 34, 35). sCD21, shed from cell membranes, is thought to inhibit IgE synthesis in human B cells by binding to free trimeric sCD23, thereby preventing the binding to mCD21 (26, 36). Abs against human CD21 modify IgE synthesis in anti-CD40-stimulated tonsil B cells in an epitope-dependent manner (24, 37). Hence, mCD21 is implicated in mediating the effects of sCD23 on IgE synthesis.

Due to the multiple forms of CD23, multiple ligands, and various activities of the different complexes, the mechanisms involved in IgE regulation by CD23 are still poorly understood. In the current study, we have focused on the positive regulation of IgE synthesis. In 2000, Mayer et al. (23) showed that IL-4- and anti-CD40-stimulated IgE synthesis in human PBMCs can be reduced by the addition of metalloprotease inhibitors. It is uncertain whether this is a direct effect on the B cells or whether it is due to inhibition of mCD23 cleavage and, therefore, sCD23 production. If sCD23 acts on B cells, are the stimulatory signals mediated by mCD21 or an unidentified counterreceptor?

To gain further insight into this question, we have stimulated purified human tonsil B cells with IL-4 and anti-CD40 and used either small interfering RNA (siRNA) to inhibit CD23 synthesis or an ADAM10 inhibitor (GI254023X) (38) to prevent cleavage of mCD23, leading to a reduction in sCD23 levels through two different mechanisms. We have followed the loss of mCD23 from the B cell surface, the appearance of sCD23 in the medium, and the expression and secretion of IgE as a function of time for up to 12 d by flow cytometry and ELISA. We have added a recombinant trimeric sCD23 (triCD23) to the ADAM10-inhibited B cells to test its ability to compensate for the reduction of endogenous sCD23. Finally, we have followed the expression of mIgE and mCD21 during the incubation of tonsil B cells with IL-4 and anti-CD40 and examined the effects of triCD23 binding to these ligands by confocal microscopy.

Materials and Methods

Isolation of human tonsil B cells

Following informed written consent, with ethical approval from Guy's Research Ethics Committee, we obtained human tonsils from donors undergoing routine tonsillectomies. The allergic status of the donor was determined by verbal communication with the parents at the time of

consent. Mononuclear cells were separated by density on a Ficoll gradient (GE Healthcare) and B cells isolated using 2-aminoethylisothiourea bromide-treated SRBCs (TCS Biosciences). B cells were routinely >98% CD20⁺ and <2% CD3⁺, as determined by flow cytometry (9).

siRNA transfection

Total B cells were transfected with CD23 siGENOME SMARTpool siRNA (3 μ g) (referred to as CD23 siRNA) or ON-TARGETplus Non-targeting siRNA Pool #1 (3 μ g) (referred to as control siRNA; Thermo Scientific Dharmacon) using the Amaxa Human B cell Nucleofector kit and Nucleofector II Device (Lonza), according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency, 30 min after transfection, was determined to be 97% using a fluorescent nonfunctional siRNA (siGLO Red; Thermo Scientific Dharmacon). The efficiency of CD23 knockdown was quantified by quantitative PCR (qPCR).

Cell culture

B cells were cultured in 24-well plates (Nunc) at 0.5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μ g/ml), glutamine (2 mM; Invitrogen), 10% FCS (Hyclone; Perbio Biosciences), transferrin (35 μ g/ml), and insulin (5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were activated with IL-4 (200 IU/ml; R&D Systems) and anti-CD40 Ab (1 μ g/ml; G28.5; American Type Culture Collection) for up to 12 d. Mouse anti-human CD21 mAb (HB5; Santa Cruz Biotechnology) was added to cells at 0.1, 1, or 10 μ g/ml. Epitope analysis has shown this clone to inhibit CD23 binding to CD21 (30). The ADAM10 inhibitor GI254023X was purified on a CombiFlash Rf (Teledyne ISCO) system (column: RediSep Rf, 4 g silica; flow rate: 18 ml/min; solvent: acetonitrile; t_R : 10 min). HPLC analysis at 220 nm confirmed a purity of $\geq 98\%$ (38). Cells were grown for 5 d to allow the upregulation of mCD23 and class-switch recombination (CSR) to IgE before addition of the inhibitor (1–15 μ M). Monomeric derCD23 (16145 Da) was made as previously described (29). IZCD23, made as previously described (9), was modified to produce the more stable trimer triCD23 (84414 Da), consisting of residues 131–321 of human CD23 prefixed by the trimerization motif (IAAIESK)₄ and expressed and refolded from inclusion bodies using the *Escherichia coli* vector pET151. This additionally provides N-terminal HIS₆ and V5 epitope tags and a TEV enzyme cleavage site that has been left uncleaved in the final product (M.W. Kao, J. Hunt, R.L. Beavil, M.N. Yahya, H.J. Gould, J.M. McDonnell, B.J. Sutton, and A.J. Beavil, manuscript in preparation). rCD23 proteins were dialyzed into PBS and sterile-filtered before addition to human B cell cultures. Concentrations were selected to be close to the calculated K_D value for trimeric CD23 binding to IgE (10^{-7} M) (9, 29) and used at a weight ratio of 1:3 (triCD23/derCD23) to maintain the same number of mIgE/mCD21 binding sites in each condition.

qPCR

Total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini kits (Qiagen), primed with oligo(dT) and random hexamers, and reverse transcribed using Superscript II (Invitrogen). qPCR was performed using TaqMan MGB gene expression assays (see below) and TaqMan Universal PCR Master Mix on a 7900HT real-time PCR machine (Applied Biosystems). Gene expression was normalized to an endogenous reference gene (β_2 -microglobulin) and quantified by $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct) analysis (SDS 2.1 software): GAPDH, Hs02786624_g1; β_2 -microglobulin, 4310886E; CD23, Hs00233627_m1; e germline transcript (eGLT) forward, 5'-CTGTCCAGGAACCCGACAGA-3', and reverse, 5'-TGCAGCAGCGGGTCAAG 3' with MGB probe 6FAM-AG GCACCAAAATG-MGB.

Flow cytometry

B cells were stained for mCD23 expression with mouse anti-human CD23-FITC (1:50; DakoCytomation) and membrane ADAM10 expression with mouse anti-human ADAM10-PE (1:50; R&D Systems) and incubated on ice in the dark for 45 min. For intracellular staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in PBS for 15 min, washed, and resuspended in permeabilization buffer (PBS, 0.05% Triton X-100, and 0.5% saponin [Sigma-Aldrich]) for 15 min. Goat anti-human IgE-FITC (1:500; Vector Laboratories) and monoclonal mouse anti-human IgG-APC (1:50; Miltenyi Biotec) were added and incubated on ice in the dark for 45 min. Collection of flow cytometry data was conducted using an FACSCalibur (BD Biosciences), with gating on live cells determined by forward versus side scatter, and events were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Ig ELISA

Maxisorp plates (Nunc) were coated with polyclonal mouse anti-human IgE (1:7000; DakoCytomation) or polyclonal goat anti-human IgG (1:1000;

AbD Serotec) in pH 9.8 carbonate buffer (distilled water, 0.2 M NaCO₃, and 0.2 M NaHCO₃) overnight at 4°C. Unbound sites were blocked with 2% milk powder in PBS + 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. Supernatant samples were then added at appropriate dilutions and plates incubated overnight at 4°C. Human serum IgE (from 800 ng/ml; NIBSC) or IgG (from 200 ng/ml; Sigma-Aldrich) were used to construct standard curves. Binding was detected by mouse anti-human IgE-HRP (1:1000; DakoCytomation) or goat anti-human IgG-HRP (1:1000; Sigma-Aldrich) in 1% milk powder in PBS + 0.05% Tween 20 for 2 h at 37°C. The color reaction was developed with *o*-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) and analyzed at 492 nm using an automated plate reader (Titertek). Ig concentration was calculated from the standard curve using GraphPad Prism 5.03 software (GraphPad, San Diego, CA), with a minimum detectable concentration of ~2 ng/ml. IgE secretion (by day 12) ranged from 2–1255 ng/ml (mean 401 ± 71 ng/ml; *n* = 26). IgG secretion (by day 12) ranged from 113–2264 ng/ml (mean 365 ± 269 ng/ml; *n* = 8).

sCD23 ELISA

Human sCD23 EASIA ELISA kits (BioSource International) were used according to the manufacturer's instructions. Briefly, supernatants were added to microtiter plates precoated with a mixture of monoclonal anti-CD23 Abs, and anti-CD23-HRP was added for 2 h at room temperature. The color reaction was developed with tetramethylbenzidine and analyzed at 450 nm. The kit recognizes the 16-, 25-, 29-, and 37-kDa fragments of sCD23, with a minimum detectable concentration of ~200 pg/ml. sCD23 production (by day 12) ranged from 13–102 ng/ml (mean 58 ± 4 ng/ml; *n* = 33).

Confocal microscopy

Human tonsillar B cells were stimulated for 8 d with IL-4 and anti-CD40, harvested, and dead cells removed by density on a Ficoll gradient. A total of 3×10^5 cells was stimulated with media alone, derCD23 (3 μM/48 μg/ml), triCD23 (1 μM/84 μg/ml), or anti-CD21 (10 μg/ml) at 37°C for 30 min. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed (with PBS + 0.05% Triton X-100), mounted onto poly-L-lysine-coated coverslips, and fixed again with 4% paraformaldehyde. Coverslip-mounted cells were stained with goat anti-human IgE-FITC (1:200; Vector Laboratories) and monoclonal mouse anti-CD21 (1:100; HB5 clone; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h, washed, and secondary anti-mouse-Alexa 594 (1:500; Molecular Probes, Invitrogen) was added for 45 min. The nuclear stain Hoechst 33258 (1:20000; Molecular Probes, Invitrogen) was added for 10 min, cells were washed three times, and immunofluorescence visualized with an SP2 confocal microscope (Leica Microsystems).

Statistical analysis

Flow cytometry and ELISA data are shown relative to control-treated cells (either transfected with control siRNA or stimulated with IL-4 and anti-CD40 alone) to compensate for interdonor variation. Data from 7 out of 33 donors who failed to respond to IL-4 and anti-CD40, with undetectable levels of IgE expression and secretion by day 12, were excluded. Data are summarized as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA with Bonferroni correction, unless otherwise stated. A *p* value of < 0.05 was considered significant (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). Significance to control conditions is indicated above data, and significance between two conditions is shown between data. Correlation analysis was performed using Spearman's rank correlation coefficient.

Results

siRNA-induced inhibition of CD23 mRNA, mCD23, sCD23, and IgE secretion

Human tonsillar B cells were transfected with a pool of four siRNA duplexes, directed against CD23, and stimulated with IL-4 and anti-CD40 for up to 12 d. A significant inhibition of CD23 mRNA expression was observed following transfection with CD23 siRNA compared with control siRNA (Fig. 1A), but no effect was seen on the expression of a nontargeted gene, GAPDH (Fig. 1B). The maximum knockdown of CD23 (70.0 ± 0.1%) occurred between 18 and 24 h following transfection, after which CD23 mRNA levels began to recover to that of control siRNA-transfected cells.

Despite the short-term inhibition of CD23 mRNA shown in Fig. 1, mCD23 protein levels were reduced following transfection with CD23 siRNA. Fig. 2A shows a representative example of flow cytometric analysis of mCD23 levels from 18 h to 12 d following

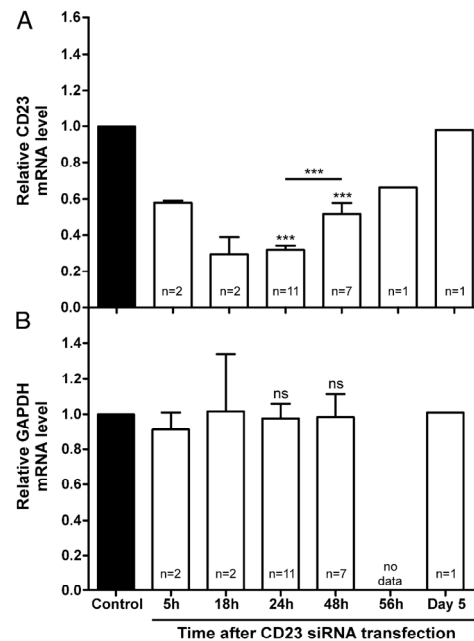
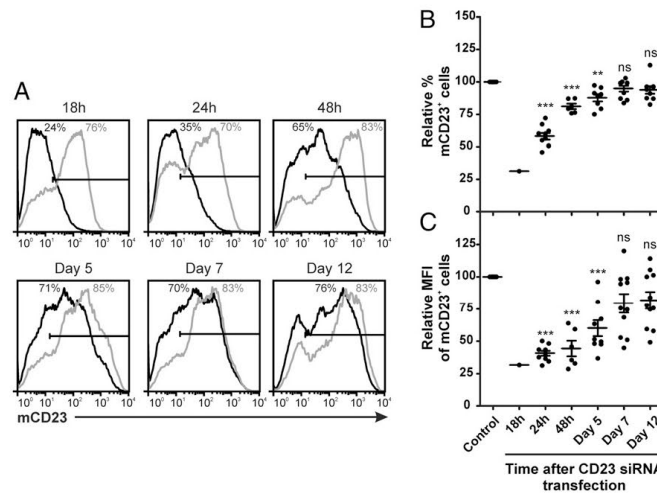


FIGURE 1. siRNA-induced inhibition of CD23 mRNA expression. Human tonsillar B cells were transfected with either control siRNA (black bars) or CD23 siRNA (white bars) and cultured for up to 5 d with IL-4 (200 IU/ml) and anti-CD40 (1 μg/ml). Cells were harvested at the times indicated, and qPCR was performed to quantify mRNA expression levels for CD23 (A) and GAPDH (B). Expression levels were calculated by $\Delta\Delta C_t$ analysis, normalized against the endogenous reference gene β_2 -microglobulin, and expressed relative to control siRNA-transfected cells at each timepoint (*n* = 11). ****p* < 0.001.

transfection with either control siRNA or CD23 siRNA. In control siRNA-transfected cells, mCD23 expression reached a peak on day 5 (88.4 ± 2.8%, *n* = 8). Fig. 2B shows that the percentage of mCD23⁺ cells was reduced following transfection with CD23 siRNA, and this reduction remained statistically significant until day 7, although it was largely recovered by 48 h. The level of mCD23 expression on cells, as measured by the mean fluorescence intensity (MFI), was significantly lower on cells transfected with CD23 siRNA compared with control siRNA (Fig. 2C). This reduction also remained statistically significant until day 7, but the MFI was suppressed to a greater degree than the percentage of mCD23⁺ cells and took longer to recover.

sCD23 is produced by cleavage of mCD23, initially by the membrane-bound metalloprotease ADAM10 (18). sCD23 was first detectable in the supernatant 4 d after transfection with either control siRNA or CD23 siRNA (data not shown). In accordance with the reduced mCD23 levels, sCD23 production decreased significantly following CD23 siRNA transfection (Fig. 3A). By day 12, sCD23 levels were, on average, 17.4% (± 5.7%) lower in supernatants from cells transfected with CD23 siRNA compared with control siRNA. No significant reduction was seen at the earlier time points of days 5 and 7. The expression level of ADAM10 was no different between control siRNA and CD23 siRNA-transfected cells at any time point during the culture (Supplemental Fig. 1), which reveals that the loss of ADAM10 was not responsible for the decrease in sCD23 levels.

FIGURE 2. Reduced mCD23 expression following CD23 siRNA transfection. **(A)** Human tonsillar B cells were transfected with either control siRNA (gray line) or CD23 siRNA (black line) and cultured for up to 12 d with IL-4 (200 IU/ml) and anti-CD40 (1 μ g/ml). mCD23 expression was analyzed by flow cytometry, and the percent of mCD23⁺ cells (above isotype control as indicated by horizontal marker) is indicated on the histograms ($n = 1$, representative of 11). Multiple donor data, relative to control siRNA-transfected cells at each time point, are shown for percent mCD23⁺ cells **(B)** and CD23⁺ MFI **(C)**, at 18 h to 12 d following transfection ($n = 11$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Because transfection with CD23 siRNA successfully resulted in reduced sCD23 levels by day 12, we next investigated the association between reduced sCD23 production and IgE synthesis at this time point. Secreted IgE (sIgE) was first detectable in the supernatant 5 d after stimulation with IL-4 and anti-CD40 (data not shown). Fig. 3A also shows the relative levels of sIgE 5, 7, and 12 d after transfection with control siRNA or CD23 siRNA. Of the 10 donors analyzed for sCD23 production, 4 donors did not pro-

duce any detectable sIgE by day 12 and so were excluded from the analysis. CD23 siRNA-transfected cells secreted 47.4% ($\pm 9.5\%$) less IgE than control siRNA-transfected cells (Fig. 3A). The extent to which sIgE levels were inhibited was not related to the amount of IgE the cells secreted. Fig. 3B correlates the level of inhibition of sCD23 production with the level of inhibition of IgE secretion. The positive correlation between sCD23 and sIgE is statistically significant ($r = 0.94$; $p = 0.0167$), as determined by

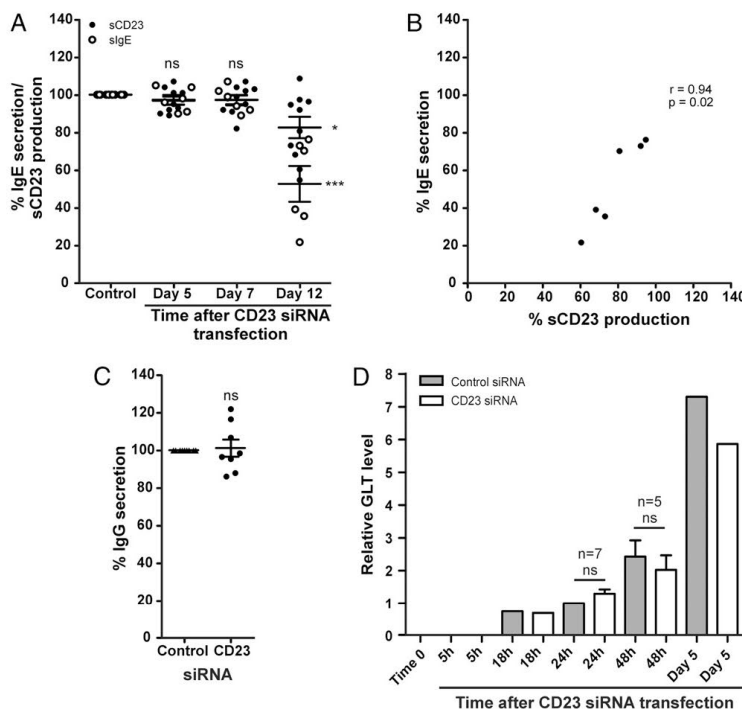


FIGURE 3. Inhibition of sCD23 production by CD23 siRNA correlates with reduced IgE secretion. Human tonsillar B cells were transfected with either control siRNA or CD23 siRNA and cultured for up to 12 d with IL-4 (200 IU/ml) and anti-CD40 (1 μ g/ml). **(A)** Supernatants were harvested on days 5, 7, and 12, and the percent inhibition of sCD23 production (\bullet) ($n = 10$) and IgE secretion (\circ) ($n = 6$) were analyzed by ELISA, relative to control siRNA-transfected cells. **(B)** Correlation between inhibition of IgE secretion and inhibition of sCD23 production on day 12 ($n = 6$). **(C)** Supernatants were harvested on day 12, and the percent inhibition of IgG secretion was analyzed by ELISA, relative to control siRNA-transfected cells ($n = 8$). **(D)** qPCR was performed to quantify RNA levels for ϵ GLT up to 5 d following transfection with either control (gray bars) or CD23 siRNA (white bars). Expression levels were calculated by $\Delta\Delta C_t$ analysis, normalized against the endogenous reference gene β_2 -microglobulin, and expressed relative to control siRNA-transfected cells at 24 h ($n = 1$, unless indicated otherwise). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Spearman's rank correlation coefficient ($n = 6$). Importantly, CD23 siRNA transfection led to no significant changes in the levels of IgG secretion by day 12 (Fig. 3C). From day 7 onwards, following transfection with CD23 siRNA, mCD23 levels had returned to those of control siRNA-transfected cells (Fig. 2B, 2C). Thus, any CD23-mediated differences in IgE secretion between days 7 and 12 can be attributed to sCD23 rather than mCD23.

Fig. 3D shows qPCR analysis of eGLT, an early marker of CSR to IgE. No significant differences in eGLT levels were detected between control siRNA and CD23 siRNA-transfected cells at either 24 or 48 h following transfection, despite the inhibition of IgE secretion shown in Fig. 3A. Membrane and intracellular staining for IgE and IgG, analyzed by flow cytometry, showed no significant changes in the percentage of IgE⁺ or IgG⁺ cells between control siRNA and CD23 siRNA-transfected cells at days 7 or 12 (Supplemental Fig. 2). In addition, there were no differences in general cell viability (live cell gating determined by forward versus side scatter) or maturation (CD38 expression) between control siRNA and CD23 siRNA-transfected cells (data not shown).

ADAM10 inhibition with GI254023X reduces mCD23 shedding, sCD23 release, and IgE secretion

Because CD23 siRNA transfection reduced sCD23 through the early reduction of mCD23 expression, a different approach was taken that would reduce sCD23 levels through preventing mCD23 shedding, thus maintaining mCD23 levels. To achieve this, we used the ADAM10 inhibitor GI254023X. Human tonsillar B cells were stimulated with IL-4 and anti-CD40 for 5 d, after which GI254023X was added at 1–15 μ M. The addition of GI254023X did not lead to a significant increase in the percentage of CD23⁺ cells, although a significant dose-dependent accumulation of mCD23 on the surface of CD23⁺ cells (as measured by MFI) was observed by day 12 (Fig. 4A). With the addition of 10 μ M GI254023X, this was accompanied by a significant reduction in sCD23 production ($28.3 \pm 9.9\%$) (Fig. 4B) and a significant reduction in IgE secretion ($64.9 \pm 7.2\%$) (Fig. 4C), with no effect on IgG secretion (data not shown).

To assess the mechanism of action, GI254023X was added at days 8 or 10, in addition to day 5, and sCD23 and sIgE levels were determined at day 12. Fig. 4B and 4C show that when the inhibitor was added progressively later in the incubation period, the levels of both sCD23 and sIgE were higher, due to the shorter time period in which GI254023X could inhibit mCD23 shedding. However, inhibition of sCD23 production and IgE secretion could still be achieved even when GI254023X was added as late as day 10 in the incubation period. In further support of this association, Fig. 4D shows the relationship between sCD23 and sIgE levels, measured in the supernatant following 12 d stimulation with IL-4 and anti-CD40. The sCD23 concentrations are indicated in nanograms per milliliter, and also in micromoles, to facilitate comparison with the known K_D values of interaction with IgE and CD21 (see Discussion). The positive correlation between sCD23 and sIgE is statistically significant ($r = 0.77$; $p \leq 0.0001$), as determined by Spearman's rank correlation coefficient ($n = 33$). There appear to be two phases in the relationship, separated by a threshold concentration of sCD23 (60 ng/ml/1.6 μ M), above which a steep rise in IgE secretion was observed.

Effect of exogenous sCD23 fragments on IgE secretion

We have previously shown that oligomeric sCD23 (IzCD23) above a certain threshold concentration upregulates, whereas monomeric sCD23 (derCD23) downregulates, IgE production from human tonsillar B cells (9). The IgE-potentiating ability of the more stable

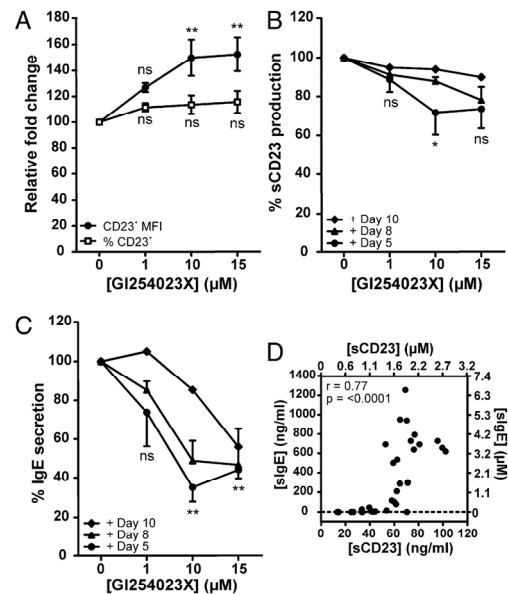


FIGURE 4. ADAM10 inhibition with GI254023X reduces mCD23 shedding, sCD23 release, and IgE secretion. Human tonsillar B cells were cultured for 12 d with IL-4 (200 IU/ml) and anti-CD40 (1 μ g/ml) in the absence or presence of varying concentrations of GI254023X, added on day 5 unless otherwise stated. (A) mCD23 expression was analyzed by flow cytometry on day 12 and the fold change plotted for the percent of mCD23⁺ cells (\square) and CD23⁺ MFI (\bullet), relative to cells cultured with IL-4/anti-CD40 alone ($n = 6$). (B) GI254023X was added on days 5 (\bullet) ($n = 6$), 8 (\blacktriangle) ($n = 2$), or 10 (\blacklozenge) ($n = 1$), and supernatants were analyzed on day 12 for sCD23 (B) production and IgE secretion (C), relative to cells cultured with IL-4/anti-CD40 alone. (D) Correlation between sCD23 and sIgE levels after 12 d ($n = 33$). Values are shown in nanograms per milliliter on the bottom x-axis and left y-axis and in micromoles on the top x-axis and right y-axis (1 μ M 190-kDa sIgE = 190 ng/ml; 1 μ M 37-kDa sCD23 = 37 ng/ml). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

triCD23 was assessed by culturing B cells with IL-4, anti-CD40, and triCD23 (1 μ M) (added at day 0) for 12 d. Although not a naturally occurring fragment, triCD23 has been specifically designed to mimic the trimeric state of endogenous sCD23 when it is first cleaved off the membrane in allergic tissues. Western blot analysis showed triCD23 did not degrade into smaller fragments during the 12 d in culture (data not shown). Analysis by ELISA on day 12 showed a 200.0% ($\pm 27.2\%$) increase in IgE secretion from cells cultured with triCD23 compared with IL-4 and anti-CD40 alone, whereas cells cultured with monomeric derCD23 produced significantly less IgE (Fig. 5A). These effects were isotype specific, as IgG secretion remained unaffected, and flow cytometric analysis showed triCD23 had no effect on the percentage of IgE⁺ cells (Supplemental Fig. 3), suggesting that triCD23 preferentially promotes expression of the secreted form of IgE.

The ability of triCD23 to rescue the inhibition of sCD23 production and IgE secretion caused by addition of the ADAM10 inhibitor (GI254023X) was then investigated. As shown in Fig. 5B, IgE secretion increased 2.3-fold when GI254023X (5 μ M) was cocultured with triCD23 (1 μ M) compared with GI254023X alone.

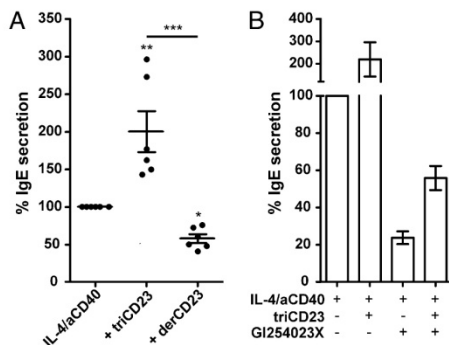


FIGURE 5. Effect of exogenous sCD23 fragments on IgE secretion. (A) Human tonsillar B cells were cultured for 12 d with IL-4 (200 IU/ml) and anti-CD40 (1 μ g/ml) alone, + triCD23 (1 μ M/84 μ g/ml), or + derCD23 (3 μ M/48 μ g/ml). Supernatants were analyzed on day 12 for IgE secretion, relative to cells cultured with IL-4/anti-CD40 alone ($n = 6$). (B) Human tonsillar B cells were cultured for 12 d with IL-4/anti-CD40 alone, + triCD23 (1 μ M), + GI254023X (5 μ M), or + triCD23 and GI254023X. Supernatants were analyzed on day 12 for IgE secretion, relative to cells cultured with IL-4/anti-CD40 alone ($n = 2$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Trimeric sCD23 colocalizes mIgE and mCD21

Having established in this study that sCD23 was involved in the positive regulation of IgE, we next sought to identify the mechanism by which this may occur. Confocal microscopy was used to test the binding of triCD23 to mIgE and mCD21 and visualize the surface dynamics of these complexes. Human tonsillar B cells were cultured with IL-4 and anti-CD40 for 8 d to ensure sufficient time for the dual expression of mIgE and mCD21 (Supplemental Fig. 4)

and then stimulated for 30 min in the presence of media alone, derCD23, or triCD23. The left and middle panels of Fig. 6A show the uniform distribution of mIgE and mCD21 on the surface of B cells incubated with either media alone or monomeric derCD23, respectively. The right panel of Fig. 6A shows the redistribution and colocalization of mIgE and mCD21, following incubation with triCD23. Several distinct microclusters formed, and particularly strong capping of mIgE and CD21 is indicated on the merged image in the bottom right panel of Fig. 6A.

To further investigate the role of mCD21 in the sCD23-mediated regulation of IgE synthesis, tonsil B cells were cultured with increasing concentrations of an anti-CD21 mAb (HB5 clone) for 12 d. Fig. 6B shows the addition of anti-CD21 resulted in a dose-dependent decrease in IgE secretion. This was accompanied by an increase in mCD23 expression and a decrease in sCD23 production (data not shown). When cells were cultured with a combination of anti-CD21 (10 μ g/ml) and triCD23 (1 μ M), the IgE-stimulating effects of triCD23 were blocked. Fig. 6C shows confocal microscopy analysis of mCD21 expression. Total B cells were cultured with IL-4 and anti-CD40 for 8 d and then stimulated for 30 min in the presence of anti-CD21, triCD23, or anti-CD21 and triCD23. Distinct microclusters of mCD21 formed on the surface of cells stimulated with either anti-CD21 or triCD23. In the cells pretreated with anti-CD21 before stimulation with triCD23, the distribution of mCD21 was more uniform. Together, these data support the hypothesis shown in Fig. 7, whereby trimeric sCD23 molecules can bind both mIgE and mCD21 to stimulate IgE synthesis.

Discussion

The cytokines IL-4 and IL-13 induce the CSR to all Ig isotypes downstream from C μ in the H-chain locus on human chromosome 14, but can be replaced by other cytokines for switching to isotypes other than IgE. IL-4 upregulates CD23, so that the expression of CD23 and IgE are inextricably linked (25). The role of

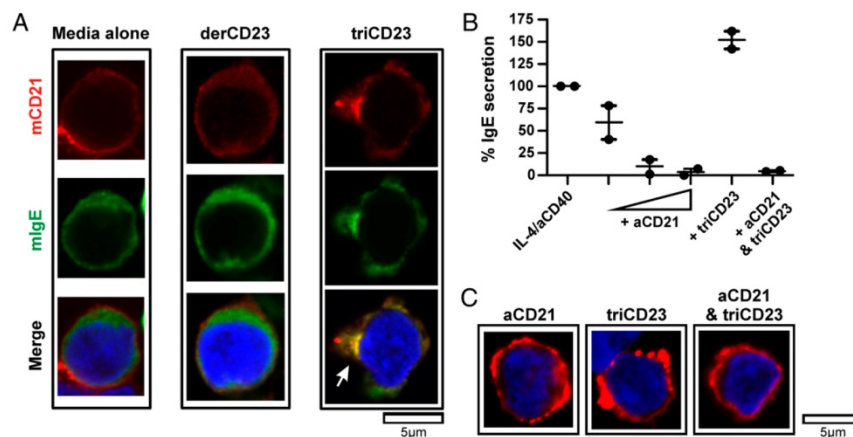


FIGURE 6. triCD23 colocalizes both mIgE and mCD21 to upregulate IgE secretion. (A) Human tonsillar B cells were cultured for 8 d with IL-4 (200 IU/ml) and anti-CD40 (1 μ g/ml) and stimulated for 30 min with media alone, derCD23 (3 μ M/48 μ g/ml), or triCD23 (1 μ M/84 μ g/ml). Cells were stained with mouse anti-CD21, plus secondary anti-mouse-Alexa 594 (red), anti-IgE-FITC (green), and the nuclear stain Hoescht (blue). Cells were visualized by confocal microscopy and images show a single field of view, with the bottom panel showing a three-color overlay. The white arrow indicates strong capping of mIgE with mCD21 ($n = 1$, representative of 3). Scale bar, 5 μ m. (B) Human tonsillar B cells were cultured for 12 d with IL-4/anti-CD40 alone, + anti-CD21 (0.1, 1, or 10 μ g/ml), + triCD23 (1 μ M), or + anti-CD21 (aCD21; 10 μ g/ml) and triCD23. IgE secretion was analyzed by ELISA on day 12, relative to cells cultured with IL-4/anti-CD40 alone ($n = 2$). (C) Cells were cultured as described in (A) and stimulated with anti-CD21 (10 μ g/ml), triCD23 (1 μ M), or anti-CD21 and triCD23. Cells were stained for mCD21 (red) and the nucleus (blue), as previously described for (A), and visualized by confocal microscopy ($n = 1$). Scale bar, 5 μ m.

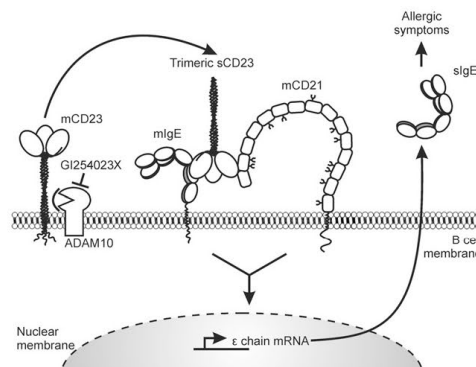


FIGURE 7. Proposed mechanism of IgE upregulation by trimeric sCD23. In this model, mCD23 is cleaved by ADAM10 to release trimeric sCD23, which coligates both mIgE and mCD21 on the surface of IgE-committed B cells to upregulate IgE synthesis, triggering the onset of allergic symptoms.

CD23 in the regulation of IgE in the human system appears to be more complex than in the mouse (2).

Negative regulation of IgE synthesis through mCD23 occurs in murine B cells *in vivo* (13, 39) and in human B cells *in vitro* (15). In human B cells, this requires the cross-linking of mCD23 (e.g., by Abs or Ag–IgE complexes). In the current study, we focused on a suggested mechanism by which sCD23 positively regulates IgE synthesis exclusively in human B cells (9, 29). In analyzing this mechanism, it is necessary to consider that there are multiple forms of sCD23, several potential ligands, and various complexes with different affinities and topological constraints associated with binding to their ligands in solution and particularly on cells.

sCD23 is released from cells by the action of an endogenous metalloprotease, identified as ADAM10 (17, 18), and accumulates in the supernatant of B cells following IL-4- and anti-CD40-stimulated CSR to IgE (23, 40, 41). In this study, we have used CD23 siRNA and an ADAM10 inhibitor (GI254023X) to confirm that mCD23 expression and cleavage to release sCD23 is required for the enhancement of IgE synthesis in primary human B cells.

Short-term inhibition of CD23 mRNA with siRNA led to a significant reduction in the frequency and MFI of CD23⁺ cells until day 7 following transfection. By day 12, but not at the earlier time points of days 5 and 7, CD23 siRNA-transfected cells showed significantly reduced sCD23 production, which correlated with reduced IgE secretion, implicating sCD23 in the upregulation of human IgE synthesis (Figs. 1–3).

To further investigate the role of sCD23, ADAM10 was inhibited using GI254023X. It has been previously been shown that inhibition of ADAM10 *in vivo* (20, 42), and the addition of GI254023X to human tonsil B cells (18), results in decreased sCD23 production. However, subsequent effects on IgE were not analyzed. In this study, addition of GI254023X resulted in increased mCD23 expression, reduced sCD23 production, and reduced IgE secretion. Inhibition of sCD23 production and IgE secretion could still be achieved when GI254023X was added progressively later in the incubation period, albeit to lesser extents, indicating that the ADAM10 inhibitor is regulating secretion of IgE by a postswitch event (Fig. 4). Because mCD23 is not cleaved, but is actually elevated in these conditions, the observed inhibition of IgE synthesis firmly points to positive regulation mediated through sCD23. Derepression of negative signaling through

mCD23 does not appear to play a major role. When sIgE binds to mCD23, it blocks metalloprotease cleavage and the release of sCD23 (16). However, this is not a complication in the present system, as the sIgE concentrations in the medium ($<10^{-10}$ M) are well below the K_D of the IgE–mCD23 interaction. As in previous work with alternative matrix metalloprotease inhibitors and IL-4-stimulated human PBLs (23), we conclude that sCD23 is required to maintain IgE synthesis in human B cells.

We confirmed the findings from previous studies (9, 23, 26) that addition of recombinant trimeric sCD23 (triCD23) to primary human B cells enhances IgE synthesis (Fig. 5A). We now also show that when B cells are incubated with GI254023X in the presence of triCD23, a relief from GI254023X-mediated IgE suppression is observed (Fig. 5B), confirming the positive regulation of IgE synthesis by sCD23. However, the level of IgE synthesis was not fully restored to that of cells cultured only with triCD23. This might be explained by off-target effects of the ADAM10 inhibitor. Further studies are required to investigate this possibility.

mIgE and mCD21 are the prime candidates for mediating the stimulatory effects of sCD23. We show in this study that mCD21 expression declines in the first few days of incubation with IL-4 and anti-CD40 and reaches a plateau on day 5 (Supplemental Fig. 4). Loss of mCD21 is probably due to the shedding of soluble fragments (43), and further shedding may be prevented by the binding of sCD23 to mCD21 and mIgE. Although the concentrations of endogenous sCD23 (Fig. 4D) are far lower than the K_D for the 1:1 interaction with mCD21 or mIgE ($K_D = 10^{-6}$ and 10^{-8} M, respectively) (9, 29), the avidity effect of binding of three sCD23 heads as a trimer to multiple mCD21 and/or mIgE molecules may dramatically enhance binding affinity at the cell surface. Prior binding of sCD23 to mIgE, the stronger ligand, may enable the recruitment of mCD21 into a trimolecular complex. The CD23 binding site for the two N-terminal domains of CD21 lies in the C-terminal tail and is sufficiently distant from the IgE binding site to allow the simultaneous binding of both ligands in solution (29). Indeed, the observed capping of mIgE and mCD21 on B cells stimulated with triCD23 (Fig. 6A) reveals that there are likewise no topological constraints to prevent a trimeric CD23 molecule from coligating mIgE and mCD21 and forming the predicted multimolecular network on the cell surface (29). In cells in which CD23 binding to mCD21 is blocked with the addition of an anti-CD21 mAb, triCD23 is no longer able to increase IgE secretion (Fig. 6B).

Fig. 4D reveals that there is a remarkable relationship between the concentration of sCD23 and sIgE after incubation of tonsil B cells with IL-4 and anti-CD40. There appears to only be a slight increase in sIgE at low sCD23 concentrations, up to 60 ng/ml (1.6 μ M) (concentrations calculated for the 37-kDa fragment). However, above this threshold, we observed a steep rise in sIgE with increasing concentrations of sCD23. The relationship shown in Fig. 4D may reflect the avidity of sCD23 in the trimolecular complexes with mIgE and mCD21 at the surface of the fluid B cell membrane, as this curve exhibits cooperativity.

Earlier work has shown that the incubation of PBMCs with sCD23 stimulates ongoing IgE synthesis, rather than increasing CSR to IgE, which would require stimulation by IL-4 (or IL-13) (41). In our system, with IL-4 and anti-CD40 stimulation, we observed no difference in the expression of ϵ GLT, an early marker for CSR, in CD23 siRNA- compared with control siRNA-transfected cells (Fig. 3D). Neither inhibition of sCD23 through siRNA transfection nor addition of recombinant triCD23 altered the proportion of IgE⁺ or IgG⁺ cells when measured by flow cytometry (Supplemental Figs. 2, 3B). Additional experiments

with tonsil B cells have shown CSR to occur in the first few days of the incubations (P.S. Hobson, unpublished observations). However, recombinant sCD23 can still increase IgE synthesis when added as late as day 9 in the incubations (M.R. Jutton, unpublished observations). It has also been shown that the addition of a metalloprotease inhibitor terminates incremental IgE synthesis after CSR has occurred (Fig. 4C) (23). Taken together, these experiments indicate an isotype-specific role for sCD23 in promoting IgE synthesis through a postswitch mechanism.

Fearon and Carter (31) showed that coligation of Ag-specific IgM and the CD19–CD21–TAPA complex on naive B cells by Ag, covalently linked to the C3d fragment of complement, stimulates B cell proliferation in the immune response. The effect of a blocking Ab against CD21 in vivo demonstrated the importance of this mechanism for a robust T cell-dependent immune response (44). The mechanism operates by synergistic signaling through IgM and CD21 to augment the expression of the B cell survival factors Bcl-X_L and Bcl-2, respectively (45). CD23 expressed in a fibroblast cell line can mimic the activity of the Ag–C3d complexes in lowering the threshold of B cell proliferation by an anti-IgM (surrogate Ag) (46). However, it is not known whether mIgE can mimic mIgM in this mechanism. The cytoplasmic sequence of IgE, required for survival, differs from that of IgM (and other isotypes) (47), although mIgE is associated with the same signal transduction proteins (the α and β subunits) as other isotypes (48). Evidently, mIgE has some capacity for signaling, but nothing is known about the signal transduction pathways.

It is informative to consider the sequence of events after placing the B cells into culture with IL-4 and anti-CD40. At first, sCD23 can only bind to mCD21, which may elicit a proliferative response (49). When IgE is expressed on the membrane, sCD23 appears to sequester the mIgE and mCD21 in raftlike structures (Fig. 6A) (29), which resemble the fate of cross-linked IgM–CD19–CD21–TAPA complexes in complement-enhanced IgM BCR activation (31, 50). Whether formation of an mIgE–sCD23–mCD21 complex would lead to similar functional consequences remains to be investigated.

In this study, two experimental approaches were taken to reduce sCD23 production in primary human B cells. Both techniques culminated in reduced sCD23 production and reduced IgE secretion, albeit through different actions on mCD23 (reduced expression or inhibition of cleavage). Each approach has its limitations, but they are different from each other, and the combined results conclusively demonstrate that sCD23 stimulates IgE synthesis in human B cells.

Our results suggest that sCD23 may be an active partner, rather than an innocent bystander, in regulating IgE synthesis and therefore a promising therapeutic target for allergic disease. Two current strategies, the anti-CD23 mAb lumiliximab, which showed efficacy in lowering IgE levels in asthmatic patients (10, 11), and metalloprotease inhibitors, already tested in mice (19), are aimed primarily at mCD23. Our results, and those from others (9, 23, 26, 41, 51), should encourage the rational design of inhibitors of sCD23 binding to its ligands for the treatment of allergy and asthma.

Acknowledgments

We thank the staff at the Evelina Children's Hospital and Guy's and St. Thomas' National Health Service Foundation Trust for help with the collection of tonsils. We also thank R.L. Beavil and C. Wu of the Medical Research Council and Asthma UK Protein Production Facility for providing the anti-CD40 mAb and the design of triCD23.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Spiegelberg, H. L. 1991. Fc epsilon R2/CD23: its discovery and possible functions. *Monogr. Allergy* 29: 1–8.
2. Gould, H. J., and B. J. Sutton. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 205–217.
3. Beavil, R. L., P. Graber, N. Aubonne, J. Y. Bonnefoy, and H. J. Gould. 1995. CD23/Fc epsilon RII and its soluble fragments can form oligomers on the cell surface and in solution. *Immunology* 84: 202–206.
4. Beavil, A. J., R. L. Edmeades, H. J. Gould, and B. J. Sutton. 1992. Alpha-helical coiled-coil stalks in the low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) and related C-type lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 753–757.
5. Yokota, A., H. Kikutani, T. Tanaka, R. Sato, E. L. Barsumian, M. Suemura, and T. Kishimoto. 1988. Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell* 55: 611–618.
6. Lorenzo, G. D., P. Mansueti, M. Melluso, G. Morici, D. Cigna, G. Candore, and C. Caruso. 1996. Serum levels of total IgE and soluble CD23 in bronchial asthma. *Mediators Inflamm.* 5: 43–46.
7. Di Lorenzo, G., A. Drago, M. E. Pellitteri, G. Candore, A. Colombo, M. Potestio, A. Di Salvo, S. Mansueti, and C. Caruso. 1999. Serum levels of soluble CD23 in patients with asthma or rhinitis monosensitive to Parietaria. Its relation to total serum IgE levels and eosinophil cationic protein during and out of the pollen season. *Allergy Asthma Proc.* 20: 119–125.
8. Yanagihara, Y., M. Sarfati, D. Marsh, T. Nutman, and G. Delespesse. 1990. Serum levels of IgE-binding factor (soluble CD23) in diseases associated with elevated IgE. *Clin. Exp. Allergy* 20: 395–401.
9. McCloskey, N., J. Hunt, R. L. Beavil, M. R. Jutton, G. J. Grundy, E. Girardi, S. M. Fabiane, D. J. Fear, D. H. Conrad, B. J. Sutton, and H. J. Gould. 2007. Soluble CD23 monomers inhibit and oligomers stimulate IGE synthesis in human B cells. *J. Biol. Chem.* 282: 24083–24091.
10. Rosenwasser, L. J., W. W. Busse, R. G. Lizzambri, T. A. Olejnik, and M. C. Totoritis. 2003. Allergic asthma and an anti-CD23 mAb (IDEC-152): results of a phase I, single-dose, dose-escalating clinical trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 563–570.
11. Rosenwasser, L. J., and J. Meng. 2005. Anti-CD23. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 29: 61–72.
12. Cho, S. W., M. A. Kilmon, E. J. Studer, H. van der Putten, and D. H. Conrad. 1997. B cell activation and Ig, especially IgE, production is inhibited by high CD23 levels in vivo and in vitro. *Cell. Immunol.* 180: 36–46.
13. Yu, P., M. Kosco-Vilbois, M. Richards, G. Köhler, and M. C. Lamers. 1994. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369: 753–756.
14. Nakamura, T., W. S. Kloetzer, P. Brams, K. Hariharan, S. Chant, X. Cao, M. J. LaBarre, P. C. Chinn, R. A. Morena, W. S. Shestowsky, et al. 2000. In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependent on the immunoglobulin Fc domain. *Int. J. Immunopharmacol.* 22: 131–141.
15. Sherr, E., E. Macy, H. Kimata, M. Gilly, and A. Saxon. 1989. Binding the low affinity Fc epsilon R on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis. *J. Immunol.* 142: 481–489.
16. Conrad, D. H., J. W. Ford, J. L. Sturgill, and D. R. Gibb. 2007. CD23: an overlooked regulator of allergic disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7: 331–337.
17. Lemieux, G. A., F. Blumenkron, N. Yeung, P. Zhou, J. Williams, A. C. Grammer, R. Petrovich, P. E. Lipsky, M. L. Moss, and Z. Werb. 2007. The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10. *J. Biol. Chem.* 282: 14836–14844.
18. Weskamp, G., J. W. Ford, J. Sturgill, S. Martin, A. J. Docherty, S. Swendeman, N. Broadway, D. Hartmann, P. Saftig, S. Umland, et al. 2006. ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat. Immunol.* 7: 1293–1298.
19. Mathews, J. A., J. Ford, S. Norton, D. Kang, A. Dellinger, D. R. Gibb, A. Q. Ford, H. Massay, C. L. Kopley, P. Scherle, et al. 2011. A potential new target for asthma therapy: a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) involvement in murine experimental asthma. *Allergy* 66: 1193–1200.
20. Gibb, D. R., M. El Shikh, D. J. Kang, W. J. Rowe, R. El Sayed, J. Cichy, H. Yagita, J. G. Tew, P. J. Dempsey, H. C. Crawford, and D. H. Conrad. 2010. ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo. *J. Exp. Med.* 207: 623–635.
21. Gough, L., O. Schulz, H. F. Sewell, and F. Shakib. 1999. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J. Exp. Med.* 190: 1897–1902.
22. Schulz, O., B. J. Sutton, R. L. Beavil, J. Shi, H. F. Sewell, H. J. Gould, P. Laing, and F. Shakib. 1997. Cleavage of the low-affinity receptor for human IgE (CD23) by a mite cysteine protease: nature of the cleaved fragment in relation to the structure and function of CD23. *Eur. J. Immunol.* 27: 584–588.
23. Mayer, R. J., B. J. Bolognese, N. Al-Mahdi, R. M. Cook, P. L. Flambert, M. J. Hansbury, S. Khandekar, E. Appelbaum, A. Faller, and L. A. Marshall. 2000. Inhibition of CD23 processing correlates with inhibition of IL-4-stimulated IgE production in human PBL and hu-PBL-reconstituted SCID mice. *Clin. Exp. Allergy* 30: 719–727.
24. Aubry, J. P., S. Pochon, P. Graber, K. U. Jansen, and J. Y. Bonnefoy. 1992. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 358: 505–507.
25. Delespesse, G., M. Sarfati, C. Y. Wu, S. Fournier, and M. Letellier. 1992. The low-affinity receptor for IgE. *Immunol. Rev.* 125: 77–97.
26. Bowles, S. L., C. Jaeger, C. Ferrara, J. Fingerroth, M. Van De Venter, and V. Oosthuizen. 2011. Comparative binding of soluble fragments (derCD23,

- sCD23, and exCD23) of recombinant human CD23 to CD21 (SCR 1-2) and native IgE, and their effect on IgE regulation. *Cell. Immunol.* 271: 371–378.
27. Bajorath, J., and A. Aruffo. 1996. Structure-based modeling of the ligand binding domain of the human cell surface receptor CD23 and comparison of two independently derived molecular models. *Protein Sci.* 5: 240–247.
 28. Hermann, P., M. Armant, E. Brown, M. Rubio, H. Ishihara, D. Ulrich, R. G. Caspary, F. P. Lindberg, R. Armitage, C. Maliszewski, et al. 1999. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *J. Cell Biol.* 144: 767–775.
 29. Hibbert, R. G., P. Teriete, G. J. Grundy, R. L. Beavil, R. Reljic, V. M. Holers, J. P. Haman, B. J. Sutton, H. J. Gould, and J. M. McDonnell. 2005. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J. Exp. Med.* 202: 751–760.
 30. Aubry, J. P., S. Pochon, J. F. Gauchat, A. Nueda-Marin, V. M. Holers, P. Graber, C. Siegfried, and J. Y. Bonnefoy. 1994. CD23 interacts with a new functional extracytoplasmic domain involving N-linked oligosaccharides on CD21. *J. Immunol.* 152: 5806–5813.
 31. Fearon, D. T., and R. H. Carter. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 127–149.
 32. Cherukuri, A., P. C. Cheng, and S. K. Pierce. 2001. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J. Immunol.* 167: 163–172.
 33. Dierks, S. E., W. C. Bartlett, R. L. Edmeades, H. J. Gould, M. Rao, and D. H. Conrad. 1993. The oligomeric nature of the murine Fc epsilon RII/CD23. Implications for function. *J. Immunol.* 150: 2372–2382.
 34. Texido, G., H. Eibel, G. Le Gros, and H. van der Putten. 1994. Transgene CD23 expression on lymphoid cells modulates IgE and IgG1 responses. *J. Immunol.* 153: 3028–3042.
 35. Lamers, M. C., and P. Yu. 1995. Regulation of IgE synthesis. Lessons from the study of IgE transgenic and CD23-deficient mice. *Immunol. Rev.* 148: 71–95.
 36. Frémeaux-Bacchi, V., E. Fischer, S. Lecoanet-Henchoz, J. C. Mani, J. Y. Bonnefoy, and M. D. Kazatchkine. 1998. Soluble CD21 (sCD21) forms biologically active complexes with CD23: sCD21 is present in normal plasma as a complex with trimeric CD23 and inhibits soluble CD23-induced IgE synthesis by B cells. *Int. Immunol.* 10: 1459–1466.
 37. Henchoz, S., J. F. Gauchat, J. P. Aubry, P. Graber, S. Pochon, and J. Y. Bonnefoy. 1994. Stimulation of human IgE production by a subset of anti-CD21 monoclonal antibodies: requirement of a co-signal to modulate epsilon transcripts. *Immunology* 81: 285–290.
 38. Hoettecke, N., A. Ludwig, S. Foro, and B. Schmidt. 2010. Improved synthesis of ADAM10 inhibitor GI254023X. *Neurodegener. Dis.* 7: 232–238.
 39. Cheng, L. E., Z. E. Wang, and R. M. Locksley. 2010. Murine B cells regulate serum IgE levels in a CD23-dependent manner. *J. Immunol.* 185: 5040–5047.
 40. Christie, G., A. Barton, B. Bolognese, D. R. Buckle, R. M. Cook, M. J. Hansbury, G. P. Harper, L. A. Marshall, M. E. McCord, K. Moulder, et al. 1997. IgE secretion is attenuated by an inhibitor of proteolytic processing of CD23 (Fc epsilon RII). *Eur. J. Immunol.* 27: 3228–3235.
 41. Saxon, A., Z. Ke, L. Bahati, and R. H. Stevens. 1990. Soluble CD23 containing B cell supernatants induce IgE from peripheral blood B-lymphocytes and co-stimulate with interleukin-4 in induction of IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86: 333–344.
 42. Sturgill, J. L., J. Mathews, P. Scherle, and D. H. Conrad. 2011. Glutamate signaling through the kainate receptor enhances human immunoglobulin production. *J. Neuroimmunol.* 233: 80–89.
 43. Frémeaux-Bacchi, V., I. Bernard, F. Maillet, J. C. Mani, M. Fontaine, J. Y. Bonnefoy, M. D. Kazatchkine, and E. Fischer. 1996. Human lymphocytes shed a soluble form of CD21 (the C3dg/Epstein-Barr virus receptor, CR2) that binds iC3b and CD23. *Eur. J. Immunol.* 26: 1497–1503.
 44. Hebell, T., J. M. Ahearn, and D. T. Fearon. 1991. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 254: 102–105.
 45. Roberts, T., and E. C. Snow. 1999. Cutting edge: recruitment of the CD19/CD21 coreceptor to B cell antigen receptor is required for antigen-mediated expression of Bcl-2 by resting and cycling hen egg lysozyme transgenic B cells. *J. Immunol.* 162: 4377–4380.
 46. Reljic, R., G. Cosentino, and H. J. Gould. 1997. Function of CD23 in the response of human B cells to antigen. *Eur. J. Immunol.* 27: 572–575.
 47. Achatz, G., L. Nitschke, and M. C. Lamers. 1997. Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 276: 409–411.
 48. Venkataraman, A. R., G. T. Williams, P. Dariavach, and M. S. Neuberger. 1991. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* 352: 777–781.
 49. Bohnsack, J. F., and N. R. Cooper. 1988. CR2 ligands modulate human B cell activation. *J. Immunol.* 141: 2569–2576.
 50. Pierce, S. K. 2002. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 96–105.
 51. Sarfati, M., and G. Delespesse. 1988. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J. Immunol.* 141: 2195–2199.

3.5. Eine funktionelle Rolle der Matrix-Metalloprotease-8 in der Stamm-/Vorläuferzell-Migration und deren Rekrutierung in atherosklerosen Läsionen

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:²⁹¹

Autoren: Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Luyang Lin, Changcun Fang, Guanmei Wen, Tsung-Neng Tsai, Xiangyuan Pu, David Sims, Zhongyi Zhang, Xiaoke Yin, Binia Thomaszewski, Boris Schmidt, Manuel Mayr, Ken Suzuki, Qingbo Xu, Shu Ye.
Titel: „Functional Role of Matrix Metalloprotease-8 in Stem/Progenitor Cell Migration and Their Recruitment Into Atherosclerotic Lesions“.
Journal: Circulation Research, **2013**, 112, 35-47.
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.274019.

Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins ©.

Zusammenfassung:

Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass Stamm-/Vorläuferzellen (*stem/progenitor cells*, SPCs) eine wichtige Quelle für Zellen in Atheroms sind, wodurch Läsionsbildung und Fortschritt gefördert werden. In dieser Veröffentlichung wurde der Einfluss der Matrix-Metalloprotease-8 (MMP8) auf die SPC-Migration und deren Rekrutierung in atherosklerosen Ablagerungen untersucht.

Sowohl in embryonalen Stammzellkulturen als auch in atherosklerosen Läsionen aus ApoE-mangelnden Mäusen (ApoE^{-/-}) konnte eine Expression von MMP8 nachgewiesen werden.

Durch *knockout* von MMP8 in ApoE-mangelnden Mäusen (ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-}), im Vergleich zu MMP8-bildenden und ApoE-mangelnden Mäusen (ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+}), wurde eine signifikant reduzierte Anzahl an SPCs in Atheroms und kleineren Läsionen beobachtet. *Ex vivo* Untersuchungen an Mäuseaorten mit Fluoreszenz-markierten SPCs zeigten, dass durch einen Mangel an MMP8 die Migrationsfähigkeit der SPCs gehemmt wird. Die Migration wurde zwischen arteriellen Lumen und Adventitia hin zu atherosklerose Läsionen innerhalb von 24 Stunden evaluiert. Des Weiteren wurden die Ergebnisse mit einem *in vitro* Migrationsassay verifiziert, indem auch die Migration von SPCs durch Endothelzellen, Matrigel und Collagen I von MMP8 beeinflusst wurde.

Da die Funktion von ADAM10 in der Zellmigration bereits bekannt ist, wurde der Einfluss von MMP8 auf ADAM10 in SPCs analysiert. Ein Mangel an MMP8 führt zu einer Reduktion von

reifen ADAM10 in SPCs, wohingegen das Level an pro-ADAM10 stabil bleibt. Zusätzlich konnte experimentell die Fähigkeit von MMP8, ADAM10 zu spalten, belegt werden.

Auch für E-Cadherin gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zu ADAM10 und Zellmigration, weshalb der Einfluss von MMP8 auf E-Cadherin ermittelt wurde. *Knockdown* von MMP8 oder Inkubation mit dem ADAM10-Inhibitor GI254023X **91** von SPCs reduziert die Spaltung von E-Cadherin. Weitere Experimente deuten daraufhin, dass MMP8 die SPC-Migration indirekt, womöglich via ADAM10, oder direkt fördert, indem die Konzentration an gespaltenen, löslichen E-Cadherin erhöht wird. Dieses könnte die Rolle von MMP8 mechanistisch erklären.

Darüber hinaus konnte die wichtige Funktion von MMP8 in der SPC-Rekrutierung und Anreicherung in atherosklerosen Läsionen *in vivo* bestätigt werden.

Synthetischer Beitrag zur Arbeit: GI254023X **91** (+ siehe Kapitel 3.3.1).

Functional Role of Matrix Metalloproteinase-8 in Stem/Progenitor Cell Migration and Their Recruitment Into Atherosclerotic Lesions

Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Luyang Lin, Changcun Fang, Guanmei Wen, Tsung-Neng Tsai, Xiangyuan Pu, David Sims, Zhongyi Zhang, Xiaoke Yin, Binia Thomaszewski, Boris Schmidt, Manuel Mayr, Ken Suzuki, Qingbo Xu and Shu Ye

Circ Res. 2013;112:35-47; originally published online October 15, 2012;

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.274019

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/content/112/1/35>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2012/10/15/CIRCRESAHA.112.274019.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation Research* is online at:

<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> at Queen Mary, University of London on March 12, 2013

Functional Role of Matrix Metalloproteinase-8 in Stem/Progenitor Cell Migration and Their Recruitment Into Atherosclerotic Lesions

Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Luyang Lin, Changcun Fang, Guanmei Wen, Tsung-Neng Tsai, Xiangyuan Pu, David Sims, Zhongyi Zhang, Xiaoke Yin, Binia Thomaszewski, Boris Schmidt, Manuel Mayr, Ken Suzuki, Qingbo Xu,* Shu Ye*

Rationale: Accumulating evidence indicates that stem/progenitor cells (SPCs) represent an important source of cells in atheromas and contribute to lesion formation and progression.

Objective: We investigated whether matrix metalloproteinase-8 (MMP8) played a role in SPC migration and their recruitment into atheromas.

Methods and Results: We found that SPCs in atheromas expressed MMP8 and that MMP8 knockout significantly reduced SPC numbers in atherosclerotic lesions in apolipoprotein E (ApoE)-deficient mice fed a Western diet. Further in vivo experiments showed that ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice injected with stem cells isolated from bone marrows of ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice had fewer SPCs in atheromas and smaller lesions than ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice injected with stem cells isolated from bone marrows of ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} mice. Ex vivo experiments showed that MMP8 deficiency inhibited the ability of SPCs to migrate from the arterial lumen and the adventitia into atherosclerotic lesions. In vitro assays indicated that MMP8 facilitated SPC migration across endothelial cells and through Matrigel or collagen I. We also found that MMP8 cleaved α-disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10 and that MMP8 deficiency reduced mature α-disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10 on SPCs. Knockdown of MMP8 or incubation with the α-disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10 inhibitor GI254023X decreased E-cadherin shedding on SPCs. The decrease in migratory ability of SPCs with MMP8 knockdown was reduced by incubation of such cells with culture supernatant from SPCs without MMP8 knockdown, and this compensatory effect was abolished by an antibody against soluble E-cadherin.

Conclusions: MMP8 plays an important role in SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions. (*Circ Res.* 2013;112:35-47.)

Key Words: atherosclerosis ■ matrix metalloproteinase-8 ■ migration ■ progenitor cell ■ stem cell

The pathogenesis of atherosclerosis is a chronic inflammatory process initiated by biochemical and mechanical insults such as elevated level of low-density lipoprotein cholesterol and high blood pressure.¹ Major constituents of atherosclerotic lesions include lipids, macrophages, smooth muscle cells (SMCs), and extracellular proteins, especially collagen I and III. Traditionally, it is thought that the accumulation of SMCs in atheromas results from migration of resident SMCs from the arterial media into the intima, where SMCs undergo proliferation, and that the accumulation

of monocytes/macrophages is the result of infiltration of circulating monocytes into the intima, where they differentiate into macrophages. Recent evidence, however, indicates that stem/progenitor cells (SPCs) represent another source of SMCs²⁻⁵ and monocytes/macrophages⁶⁻¹⁰ in atheromas and contribute to atherosclerotic lesion formation and progression.²⁻¹³ Studies have identified 2 sources for SPCs in atherosclerotic lesions: (1) bone marrow-derived SPCs that are recruited into atherosclerotic lesions via the blood circulation and (2) local SPCs in the vascular wall that can migrate into

Original received June 23, 2012; revision received October 9, 2012; accepted October 15, 2012. In September 2012, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 11.5 days.

From the William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, United Kingdom (Q.X., F.Z., L.L., C.F., G.W., X.P., D.S., K.S., S.Y.); Cardiovascular Division, King's College London BHF Centre, London, United Kingdom (T.-N.T., Z.Z., X.Y., M.M., Q.X.); and Clemens Schöpf Institute, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Germany (B.T., B.S.).

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.274019/-/DC1>.

Correspondence to Qingzhong Xiao, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, John Vane Science Building, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, United Kingdom (e-mail q.xiao@qmul.ac.uk; or Shu Ye, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, John Vane Science Building, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, United Kingdom (e-mail s.ye@qmul.ac.uk).

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.274019

Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> at Queen Mary, University of London on March 12, 2013

Non-standard Abbreviations and Acronyms	
ADAM10	α -disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10
ApoE	apolipoprotein E
GFP	green fluorescence protein
MMP	matrix metalloproteinase
SMC	smooth muscle cell
SPC	stem/progenitor cell

atherosclerotic lesions.^{3,10} However, the mechanisms by which SPCs are mobilized from their original sites and recruited into the atheroma are currently incompletely elucidated.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases with proteolytic activity on a variety of proteins. Collectively, the MMPs can degrade all proteins that constitute the interstitial extracellular matrix and the basement membrane. Moreover, a growing number of nonmatrix proteins have been shown to be susceptible to cleavage by MMPs. In some cases, such cleavage leads to increased activity of the proteins concerned, whereas in some other cases, the cleavage results in diminished activity.¹⁴ There is evidence indicating that certain MMPs play important roles in SPC mobilization, homing, and migration into destination tissues. For example, studies have shown that MMP9, whose expression is induced by nitric oxide,¹⁵ can cleave the membrane-bound kit ligand (also known as stem cell factor), leading to the release of this cytokine, which promotes transfer of SPCs from quiescent to proliferative niches in the bone marrow.¹⁶ It also has been demonstrated that MMP9 facilitates the incorporation of bone marrow–derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization.¹⁷ Another MMP, namely MMP14, has been shown to play a role in granulocyte colony-stimulating factor–induced progenitor cell mobilization, such that MMP14, activated by this cytokine, cleaves off the protein CD44 on progenitor cells and thus disrupts CD44-mediated binding of progenitor cells to the basement membrane in the bone marrow, thereby promoting progenitor cell mobilization and egress.¹⁸ Taken together, these studies indicate that different MMPs play divergent roles in SPC mobilization or migration.

MMP8 (also known as collagenase-2) has potent proteolytic activity on fibrillar collagens, particularly collagen I.¹⁹ It also can degrade other matrix proteins such as laminin and fibronectin.¹⁹ In addition, it has been shown to be able to cleave the chemokines CXCL5²⁰ and CXCL11.²¹ Studies of polymorphonuclear cells have shown that a substantial proportion of MMP8 binds to the cell plasma membrane and that the membrane-bound MMP8 contributes importantly to collagen I degradation.²²

Previous studies by other researchers have shown that macrophages, SMCs, and endothelial cells in atherosclerotic lesions express MMP8,²³ that lesion progression is associated with increased MMP8 expression,²⁴ and that increased plasma MMP8 levels correlate with increased risk of cardiovascular mortality,²⁵ indicating a connection between MMP8 and atherosclerosis. Further to those studies, we recently showed that MMP8 deficiency reduced atherosclerotic lesion formation in

apolipoprotein E (ApoE) knockout mice fed a Western diet, with reduced lesional macrophage and SMC content,²⁶ suggesting a causal role of MMP8 in the pathogenesis of atherosclerosis. Because of the complexity of atherogenesis and potentially a wide range of proteins that might be susceptible to cleavage by MMP8, it is possible that multiple different mechanisms contribute to the role of MMP8 in atherosclerotic lesion formation and progression, and further work would be required to elucidate the mechanisms involved. In this study, we found evidence of an important role of MMP8 in SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions.

Methods

Detailed Methods are provided in the Online Data Supplement. In brief, microscopic sections of aortic root atherosclerotic lesions from ApoE^{−/−}/MMP8^{+/−} and ApoE^{+/−}/MMP8^{+/−} mice fed²⁶ a Western diet for 12 weeks were subjected to hematoxylin and eosin staining and immunostaining for MMP8, Sca-1, CD34, c-kit, and Flk-1, respectively. In stem cell injection experiments, SPCs were isolated from bone marrows of ApoE^{+/−}/MMP8^{+/−} and ApoE^{+/−}/MMP8^{+/−} mice, respectively, and injected into ApoE^{+/−}/MMP8^{+/−} mice via the tail vein (1×10⁶ SPCs/mice). The mice were then fed a Western diet for 6 weeks or 12 weeks, and microscopic sections of aortic root atherosclerotic lesions were subjected to hematoxylin and eosin staining and immunostaining for Sca-1, c-kit, CD45, CD68, smooth muscle actin, and smooth muscle myosin heavy chain, respectively. In ex vivo transendothelial migration experiments, fluorescence-labeled embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been infected with MMP8 shRNA to knockdown MMP8 or nontarget shRNA to serve as controls were injected into the lumen of explants of aortas with atherosclerotic lesions; after closure of both ends of the vessels by ligation, the explants were cultured in the presence of stromal cell–derived factor-1 α for 24 hours, followed by examination of fluorescence-labeled cells in the atherosclerotic lesions. In ex vivo transadventitia migration experiments, fluorescence-labeled embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been infected with MMP8 shRNA or nontarget shRNA were embedded in Matrigel and then patched around the adventitia of explants of atherosclerotic aortas connected to a microcirculation system with circulating progenitor cell culture medium supplemented with stromal cell–derived factor-1 α ; after 24 hours of incubation, fluorescence-labeled cells in the atherosclerotic lesions were examined.

Embryonic Sca-1⁺ SPCs with or without exogenous MMP8 coating, embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been infected with MMP8 shRNA or nontarget shRNA (the efficiency and specificity of MMP8 shRNA knockdown in embryonic Sca-1⁺ SPCs are shown in Online Figure 1), and bone marrow–derived Sca-1⁺ SPCs from MMP8^{+/−} or MMP8^{−/−} mice were subjected to assays for migration across an endothelial monolayer or through a variety of different types of matrix proteins as follows: Matrigel, collagen I, collagen IV, gelatin, fibronectin, and elastin, respectively.

Western blot analyses and flow cytometry assays were performed to examine pro- α -disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10 (ADAM10) and mature ADAM10 on embryonic Sca-1⁺ SPCs infected with MMP8 shRNA or nontarget shRNA. A recombinant ADAM10 (amino acids 19–673) consisting of the prodomain and the other ectodomains were incubated with or without active MMP8 and subjected to Western blot analysis. Western blot analyses and flow cytometry assays were performed to examine full-length E-cadherin and shed E-cadherin on embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been infected with MMP8 shRNA or nontarget shRNA and had been incubated with or without the ADAM10 inhibitor GI254023X.^{27,28} Embryonic Sca-1⁺ SPCs with MMP8 knockdown were cultured in the presence or absence of culture supernatant from embryonic Sca-1⁺ SPCs without MMP8 knockdown, and in the presence or absence of an antibody against soluble E-cadherin, and then were subjected to assays for migration through collagen I. Levels of soluble E-cadherin in plasma samples from ApoE^{+/−}/MMP8^{+/−} and ApoE^{+/−}/MMP8^{−/−} mice were measured with the use of a commercially available ELISA kit.

Results

SPCs in Culture and Atherosclerotic Lesions Express MMP8

Previously, in an RNA microarray analysis of Sca-1⁺ SPCs derived from embryonic stem cells,^{29,30} we noted that they expressed MMP8 mRNA (unpublished data). In this study, we performed Western blot analysis and detected substantial levels of MMP8 protein in cultured Sca-1⁺ SPCs derived from

embryonic stem cells, bone marrow Sca-1⁺ SPCs, leukocytes, SMCs, and endothelial cells (Figure 1A). Immunocytochemical analysis further confirmed the expression of MMP8 in cultured Sca-1⁺ SPCs (Figure 1B). We found that MMP8 expression in embryonic Sca-1⁺ SPCs was increased after incubation with 4-hydroxynonenal and 7-ketocholesterol, components of oxidized low-density lipoprotein cholesterol (Figure 1C). Furthermore, immunohistochemical examination

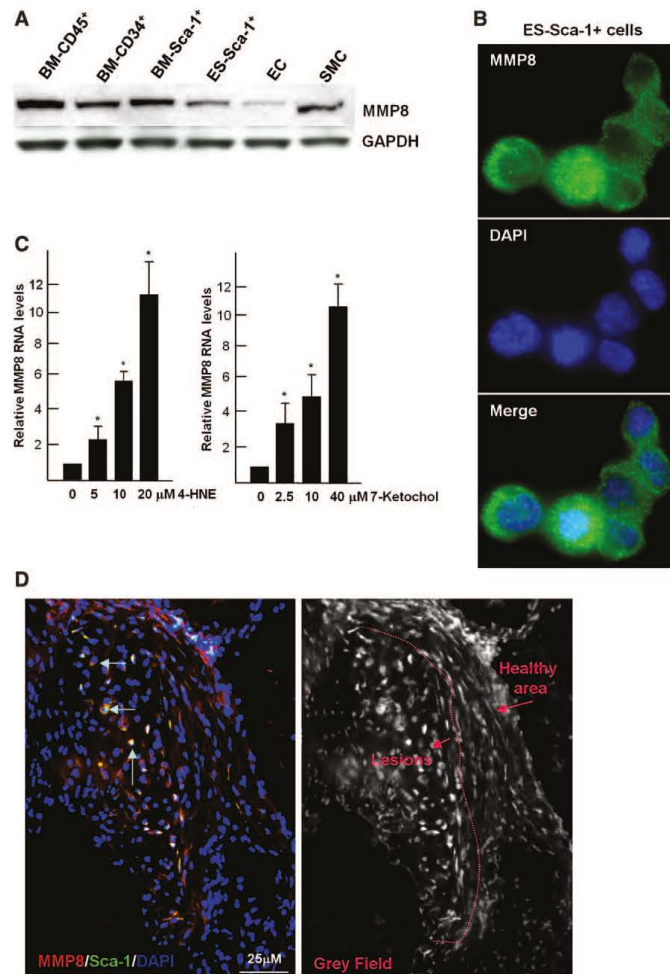


Figure 1. Stem/progenitor cells (SPCs) in culture and atherosclerotic lesions express matrix metalloproteinase-8 (MMP8). **A**, Bone marrow (BM)-derived leukocytes (CD45⁺), BM-derived stem cells (CD34⁺ and Sca-1⁺), embryonic stem (ES) cell-derived Sca-1⁺ SPCs, endothelial cells (ECs), and smooth muscle cells (SMCs) express MMP8, as demonstrated by Western blot analysis. **B**, ES cell-derived Sca-1⁺ SPCs express MMP8, as demonstrated by immunofluorescence staining. **C**, Oxidized low-density lipoprotein constituents induce MMP8 expression. Cultured Sca-1⁺ SPCs were treated with various amounts of the oxidized low-density lipoprotein constituents 4-hydroxynonenal and 7-ketocholesterol for 24 hours, followed by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of MMP8 gene expression. **D**, SPCs in atherosclerotic lesions express MMP8. ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} mice were fed a Western diet for 12 weeks, and sections of the aortic roots were subjected to double immunofluorescence staining for MMP8 and Sca-1. **White arrows** in the immunofluorescence image indicate double-positive cells in the lesion. **Right**, Gray-field image of the same section. Red dotted line indicates the boundary between the lesion and healthy area.

in atherosclerotic lesions from ApoE-deficient (ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+}) mice fed a Western diet for 12 weeks showed that Sca-1⁺ SPCs in atherosclerotic lesions expressed MMP8 (Figure 1D).

MMP8 Deficiency Reduces SPCs in Atherosclerotic Lesions

To begin to investigate whether MMP8 played a role in SPC recruitment into atherosclerotic lesions, we compared the numbers of SPCs in aortic root atherosclerotic lesions from ApoE-deficient mice with or without MMP8 knockout (ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} and ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+}, respectively). We used a panel of well-documented stem cell markers, including CD34, Sca-1, c-kit, and Flk-1, to characterize the SPCs in atherosclerotic lesions. We found that MMP8 knockout significantly reduced the numbers of CD34⁺ cells (Figure 2A),

Sca-1⁺ cells (Figure 2B), c-kit⁺ cells (Online Figure IIA), and Flk-1⁺ cells (Online Figure IIB) in atherosclerotic lesions.

MMP8 Plays a Role in SPC Migration and Recruitment Into Atherosclerotic Lesions

Having found that SPCs in culture and atherosclerotic lesions expressed MMP8 and that MMP8 knockout significantly reduced SPC numbers in atherosclerotic lesions, we examined whether MMP8 had an effect on SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions.

To determine whether MMP8 had an effect on SPC recruitment from the arterial lumen into atherosclerotic lesions, we performed ex vivo experiments in which we injected fluorescence-labeled embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been infected with MMP8 shRNA to knockdown MMP8 or nontarget shRNA to serve as controls into the lumen of

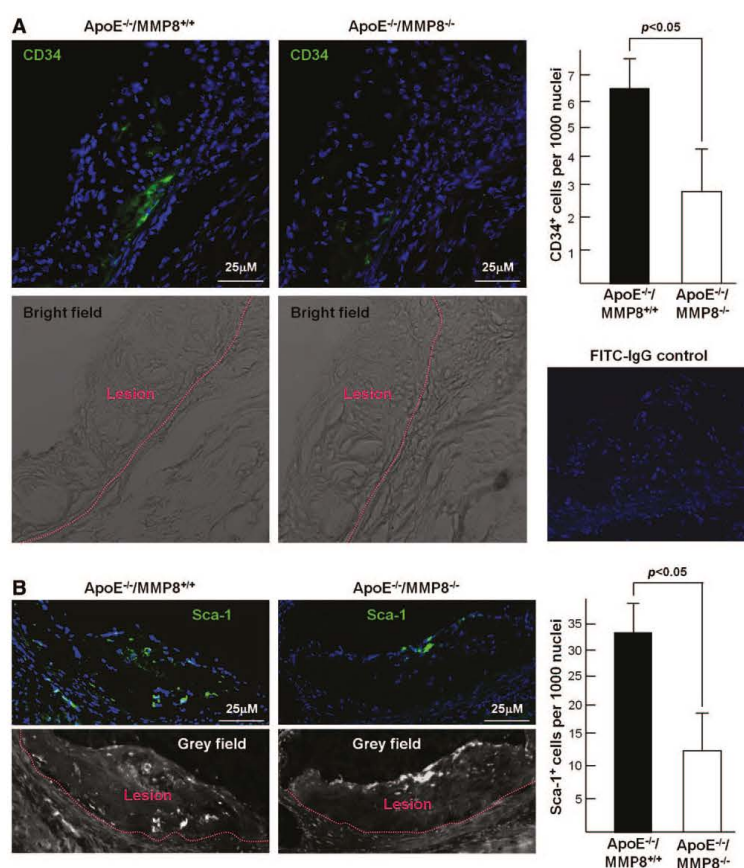


Figure 2. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) deficiency reduces stem/progenitor cells (SPCs) in aortic root atherosclerotic lesions. Both ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} and ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice were fed a Western diet for 12 weeks. Aortic roots from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} and ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice were harvested, sectioned, and subjected to immunofluorescence staining with antibodies against the stem cell markers CD34 (green) (A) and Sca-1 (green) (B). Shown on the left are representative and bright/gray-field images. Far right shows quantitative data of SPCs in atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} and ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice, respectively. Columns represent mean±SD (n=5 mice in each group). Red dotted line indicates the boundary between the lesion and healthy area. A representative image of IgG control staining is also shown.

Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> at Queen Mary, University of London on March 12, 2013

explants of mouse aortas with atherosclerotic lesions; after closing both ends of the vessels by ligation, we cultured the explants in the presence of stromal cell-derived factor-1 α for 24 hours, followed by examination of fluorescence-labeled cells in the explants. We detected large numbers of fluorescence-labeled cells in the atherosclerotic lesions (and the arterial media) in the explants injected with nontarget shRNA-infected SPCs and found that the numbers of such cells were significantly smaller in the atherosclerotic lesions (and the arterial media) in the explants injected with MMP8 shRNA-infected SPCs (Figure 3A).

To assess whether MMP8 had an effect on SPC migration from the adventitia into the arterial media and atherosclerotic lesions, fluorescence-labeled embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been infected with MMP8 shRNA or nontarget shRNA were embedded in Matrigel and then patched around the adventitia of explants of atherosclerotic aortas connected to a microcirculation system with circulating progenitor cell culture medium supplemented with stromal cell-derived factor-1 α . After culturing the explants for 24 hours, we examined fluorescence-labeled cells in atherosclerotic lesions. Similar to the above experiments, we detected larger numbers

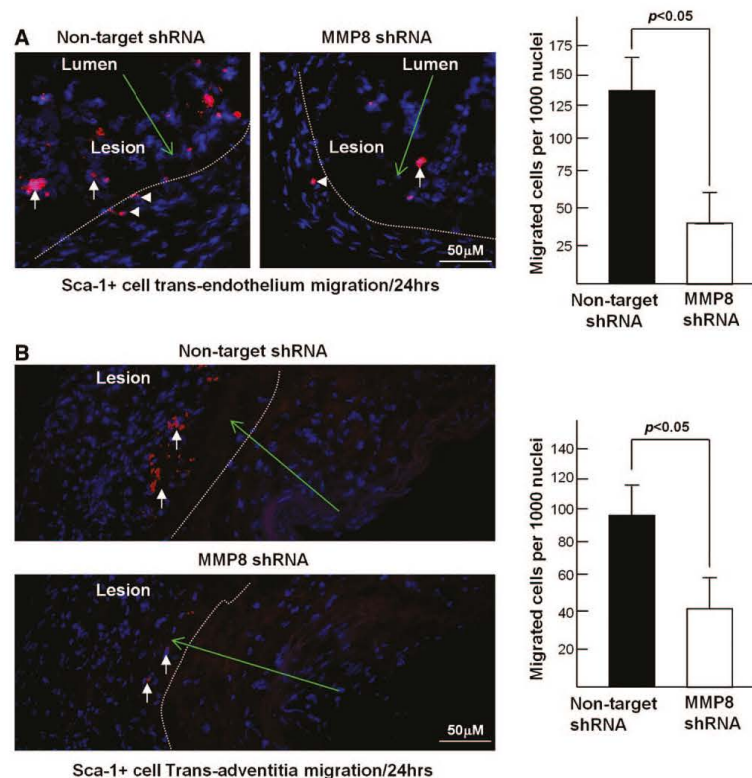


Figure 3. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockdown reduces stem/progenitor cell (SPCs) transadventitia migration and transendothelium migration in ex vivo experiments. **A**, MMP8 knockdown reduces Sca-1⁺ SPC transendothelium migration. Aortas with atherosclerotic lesions from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} mice were cut into several segments of 5 to 10 mm in length. Embryonic Sca-1⁺ SPCs (10⁵ cells) infected with nontarget shRNA or MMP8 shRNA were labeled with PKH26, washed, and injected into the lumen of the aortas. After ligation of the ends, the aortic segments were cultured in progenitor cell culture medium supplemented with 100 ng/mL of stromal cell-derived factor-1 α for 24 hours under normal cell culture conditions (5% CO₂, 21% O₂, pH 7.0–7.5, 37°C). After 24 hours of incubation, the aortic segments were harvested, cross-sectioned, and microscopically examined. **Green arrows** indicate SPC migration direction. **White arrows and arrowheads** indicate migrated SPCs in the lesion area and media layer, respectively. White dotted line indicates the boundary between the lesion and healthy area. **B**, MMP8 knockdown reduces Sca-1⁺ SPC transadventitia migration. Aortas (\approx 10 mm in length) with atherosclerotic lesions from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} mice were connected to minineedles of a microcirculation system filled with progenitor cell culture medium supplemented with 100 ng/mL of stromal cell-derived factor-1 α . Embryonic Sca-1⁺ SPCs (10⁵ cells) infected with nontarget shRNA or MMP8 shRNA were labeled with PKH26, washed, and mixed with 200 μ L of Matrigel and then patched around the adventitia of the aortic segments. After 24 hours of incubation, the aortic segments were harvested, cross-sectioned, and microscopically examined. **Green arrows** indicate direction of SPC migration. **White arrows** highlight SPCs that have migrated into the lesions. White dotted line indicates the boundary between the lesion and healthy areas. **Left**, Representative images of aortic sections. **Right**, Quantitative data of Sca-1⁺ SPCs that have migrated into atherosclerotic lesions. Columns represent mean \pm SD ($n=3$ aortas, 10 sections per aortic segment, in each group).

of fluorescence-labeled cells in the atherosclerotic lesions (and the arterial media) in the explants patched with nontarget shRNA-infected cells than in the atherosclerotic lesions (and the arterial media) in the explants patched with MMP8 shRNA-infected cells (Figure 3B).

To further verify and characterize the effect of MMP8 on SPC migration, we performed *in vitro* migration assays using embryonic Sca-1⁺ SPCs that had been incubated with or without exogenous MMP8, embryonic Sca-1⁺ SPCs infected with MMP8 shRNA or nontarget shRNA, and bone marrow-derived SPCs from mice with or without MMP8 knockout. The assays showed that incubation with exogenous MMP8 enhanced, in a dose-dependent manner, the ability of embryonic Sca-1⁺ SPCs to migrate through thick Matrigel, which mimics the vascular matrix (Figure 4A) and their ability to transmigrate across an endothelial monolayer, which mimics vascular endothelium (Figure 4B). In contrast, depletion of endogenous MMP8 by shRNAs in embryonic Sca-1⁺ SPCs significantly reduced their migratory ability (Figure 4C). Consistently, Sca-1⁺ SPCs isolated from the bone marrow of MMP8 knockout mice had significantly lower migratory ability through matrix proteins than Sca-1⁺ SPCs isolated from the bone marrow of MMP8 wild-type mice (Figure 4D and 4E).

Because it was plausible that the effect of MMP8 on cell migration would likely be partly attributable its proteolytic activity to degrade proteins in the extracellular matrix, we further investigated which types of protein in the extracellular matrix were likely to primarily account for the effect of MMP8 on cell migration. We performed migration assays using transwells coated with collagen I, collagen IV, laminin, fibronectin, or elastin, and found that MMP8 had a significant effect on embryonic Sca-1⁺ SPC migration through collagen I but not the other protein types tested (Online Figure III).

Because adhesion of SPCs to the extracellular matrix could have an effect on their mobilization and migration, we further examined whether MMP8 affected SPC adhesion to Matrigel. We found that incubation of embryonic Sca-1⁺ SPCs with MMP8 dose-dependently inhibited their adhesion to Matrigel (Online Figure IV).

We also examined whether MMP8 had an effect on SPC proliferation because this potentially could be another reason for the reduction in SPC numbers in atherosclerotic lesions of MMP8 knockout mice, but we detected no such effect (Online Figure IVB). Furthermore, we examined whether the numbers of hematopoietic SPCs (CD34⁺/CD45⁺ cells) in the bone marrow and peripheral

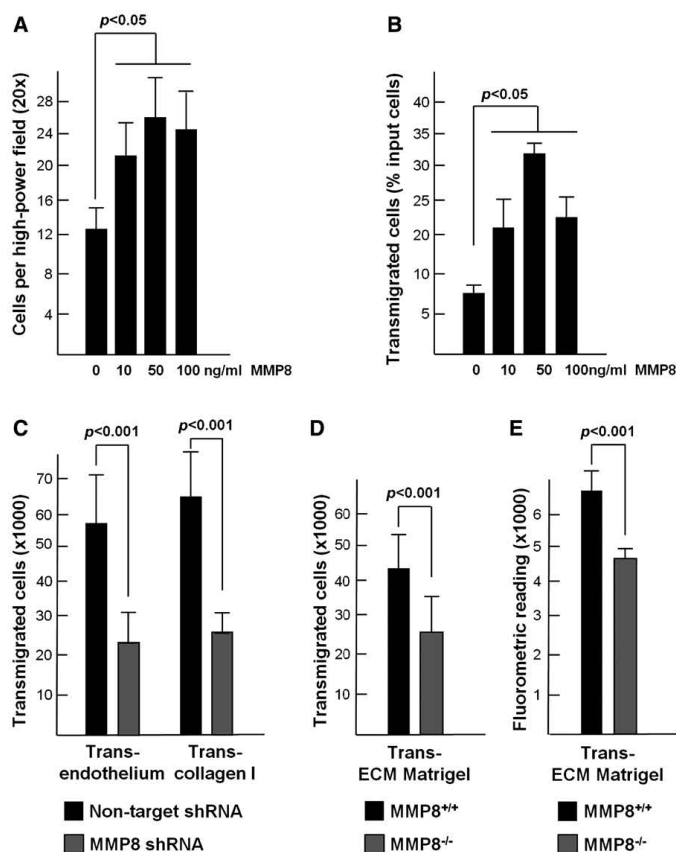


Figure 4. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) enhances stem/progenitor cell (SPC) migration in *in vitro* experiments. A and B, Incubation of SPCs with MMP8 enhances migration. Cultured embryonic Sca-1⁺ SPCs were pretreated with various amounts of MMP8 for 2 hours and then subjected to Matrigel migration assays (A) and transendothelial migration assays (B). C, Knockdown of MMP8 in SPCs reduces migration. Cultured embryonic Sca-1⁺ SPCs were infected with nontarget shRNA and MMP8 shRNA, followed by transendothelium and transcollagen I migration assays. D and E, MMP8 knockout reduces SPC migration. The migratory ability of Sca-1⁺ SPCs isolated from the bone marrow of ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} and ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice was assessed with the use of Matrigel-coated transwells (D) or extracellular matrix (ECM) invasion assay kit (E). Columns represent mean \pm SD (n=3 independent experiments).

blood were lower in MMP8 knockout mice than in MMP8 wild-type mice because this potentially could be another reason for reduced SPC numbers in atherosclerotic lesions of MMP8-deficient mice, but we observed no such difference (Online Figure V).

MMP8 Deficiency Reduces ADAM10 Maturation

In an ongoing study of vascular SMCs using proteomics techniques, we found a decrease of ADAM10 fragments in culture supernatants of vascular SMCs with MMP8 deficiency (unpublished data). Because ADAM10 had been shown to play a role in cell migration,³¹ we examined whether MMP8 deficiency had an influence on ADAM10 on SPCs. Western blot analyses showed that the ratio of the amount of mature ADAM10 vs the amount of pro-ADAM10 in protein extracts from MMP8 shRNA-infected embryonic Sca-1⁺ SPCs was significantly lower than in protein extracts from nontarget shRNA-infected embryonic Sca-1⁺ SPCs (Figure 5A). Consistently, immunofluorescent staining and flow cytometry analyses using an antibody specifically against the ADAM10 prodomain showed that the levels of pro-ADAM10 on embryonic Sca-1⁺ SPCs were increased when MMP8 had been knocked-down by shRNA (Figure 5B and 5C).

To test whether MMP8 could cleave ADAM10, we incubated a recombinant mouse ADAM10 (amino acid residues 19–673, consisting of the prodomain and the other ectodomains) with active MMP8 and performed Western blot analysis using

an antibody against the prohormone convertase cleavage site (amino acid residues 157–221) of ADAM10. At the baseline, in the presence or absence of MMP8, the Western blot analysis detected a band for the uncleaved recombinant protein (60 kDa) and 3 strong bands corresponding to ≈ 28 , ≈ 25 , and ≈ 18 kDa fragments, respectively (Figure 5D; the ≈ 28 , ≈ 25 , and ≈ 18 kDa bands are indicated by arrowheads). After 2-hour incubation without MMP8, these 4 different bands of ADAM10 remained the same, whereas after 2-hour incubation with MMP8 the intensity of the 60-kDa band was reduced, the ≈ 28 and ≈ 25 kDa bands almost completely disappeared, and a new band of ≈ 20 kDa appeared, whereas the intensity of the ≈ 18 kDa band remained approximately the same (Figure 5D).

MMP8 Deficiency Reduces E-cadherin Shedding Likely by ADAM10

Our ongoing study of vascular SMCs using proteomics techniques also showed a reduction of E-cadherin fragments in culture supernatants of vascular SMCs with MMP8 deficiency (unpublished data). Because it had been reported that ADAM10 could shed E-cadherin on epithelial cells and thereby promote epithelial cell migration,³¹ and because we had found a reduction in the amount of mature ADAM10 on MMP8-depleted SPCs, we examined whether MMP8 knockdown or ADAM10 inhibition could lead to a change in E-cadherin on SPCs. Western blot analyses showed that

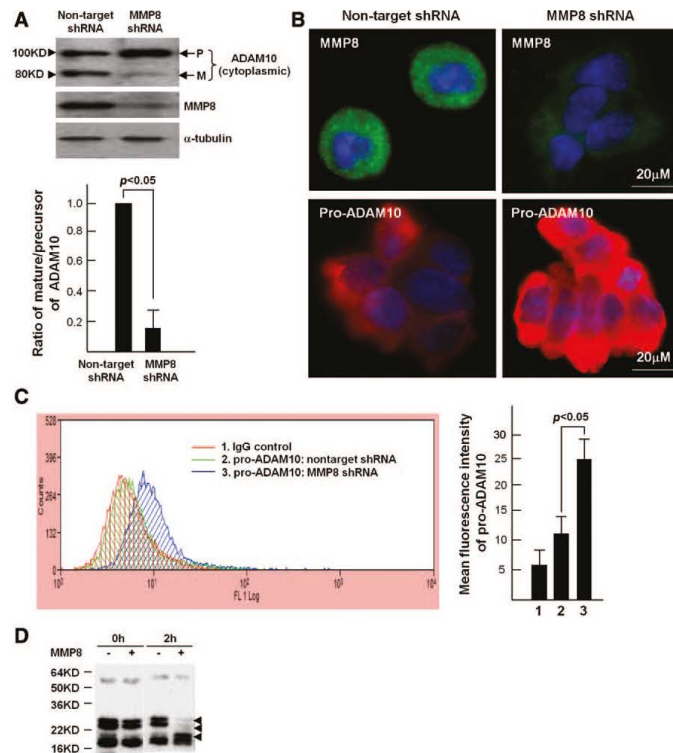


Figure 5. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) depletion reduces a-disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10 (ADAM10) maturation on stem/progenitor cells (SPCs). A to C, MMP8 knockdown reduces the amount of mature ADAM10 on SPCs. Cultured embryonic Sca-1⁺ SPCs were infected with nontarget shRNA or MMP8 shRNA and subjected to Western blot analysis with antibodies against ADAM10 (cytoplasmic domain), MMP8, or α -tubulin (A); immunofluorescence staining with antibodies against ADAM10 (prodomain) or MMP8 (B); and flow cytometric analysis with an antibody against ADAM10 (prodomain) (C). Representative images of Western blot, immunofluorescence staining, and flow cytometric analysis, respectively, are presented. Column chart in (A) shows quantitative data of the ratio of the amount of mature ADAM10 (M) vs the amount of pro-ADAM10 (P). Column chart in (C) shows mean fluorescence intensity for ADAM10 (prodomain) in Sca-1⁺ SPCs infected with nontarget shRNA or MMP8 shRNA (n=3 independent experiments). D, MMP8 cleaves ADAM10. Recombinant ADAM10 (amino acid residues 19–673, consisting of the prodomain and the other ectodomains, 500 ng; Sigma, A9975) was incubated with activated MMP8 (50 ng) in assay buffer for 0 and 2 hours, respectively, followed by Western blot analysis with an antibody against the prohormone convertase cleavage site (amino acid residues 157–221) of ADAM10 (Abcam, ab39153). Arrowheads indicate ADAM10 fragments affected by MMP8 incubation.

knockdown of MMP8 in embryonic Sca-1⁺ SPCs with MMP8 shRNA and incubation of Sca-1⁺ SPCs with the ADAM10-specific inhibitor GI254023X^{27,28} increased the ratio of the amount of full-length E-cadherin vs the amount of E-cadherin

transmembrane cytoplasmic fragment in protein extracts from these cells (Figure 6A1 and 6B), suggesting a reduction in E-cadherin ectodomain shedding, probably by ADAM10, on MMP8-depleted SPCs. Consistently, flow cytometry analyses

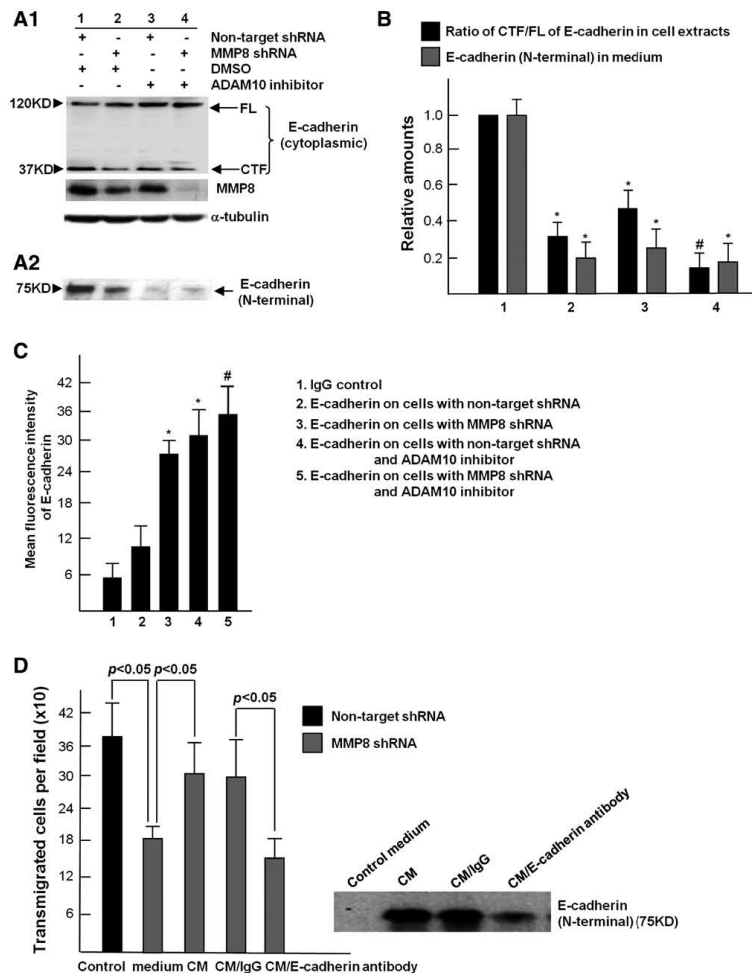


Figure 6. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) depletion or a-disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10 (ADAM10) inhibition reduces E-cadherin shedding on stem/progenitor cells (SPCs) and decreases soluble E-cadherin-induced SPC migration. A to C, MMP8 knockdown or ADAM10 inhibition reduces E-cadherin shedding on SPCs. Cultured embryonic Sca-1⁺ SPCs were infected with nontarget shRNA or MMP8 shRNA, followed by 3 days of culture in the presence or absence of the ADAM10 inhibitor GI254023X (5 μ mol/L). Cell lysates were harvested and subjected to Western blot analyses with antibodies against E-cadherin (cytoplasmic domain) or MMP8 (A1). Conditioned media were also harvested and subjected to Western blot analysis with an antibody against E-cadherin (N-terminal) (A2). A1 and A2, Representative images of Western blot analyses. B, Western blot densitometric quantitative data (black columns show the relative amounts of C-terminal fragment [CTF] of E-cadherin vs the amount of full-length [FL] E-cadherin in cell lysates; gray columns show the relative amounts of N-terminal E-cadherin in conditioned media. n=3 independent experiments, * P <0.05 [treatment vs control], # P <0.05 [MMP8 shRNA plus GI254023X vs MMP8 shRNA or vs GI254023X]). C, Flow cytometric analyses of Sca-1⁺ SPCs that had been treated as in (A), with an antibody against E-cadherin (N-terminal). The column chart presentation of quantitative data of mean fluorescence intensity in the flow cytometric analyses (n=3 independent experiments, * P <0.05 [column 3 or 4 vs column 2], # P <0.05 [column 5 vs column 3]). D, Soluble E-cadherin induces SPC migration. Conditioned culture medium of Sca-1⁺ SPCs were concentrated 10 \times , incubated with rat IgG (CM/IgG) or an antibody against E-cadherin N-terminus (CM/DECAM-1) or neither (CM), and then transferred to cultures of MMP8 shRNA-infected Sca-1⁺ SPCs, followed by transcollagen I migration assays. Columns represent mean \pm SD (n=3 independent experiments). Also shown is a representative image of Western blot analysis of concentrated conditional medium, with the use of the E-cadherin N-terminus antibody.

Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> at Queen Mary, University of London on March 12, 2013

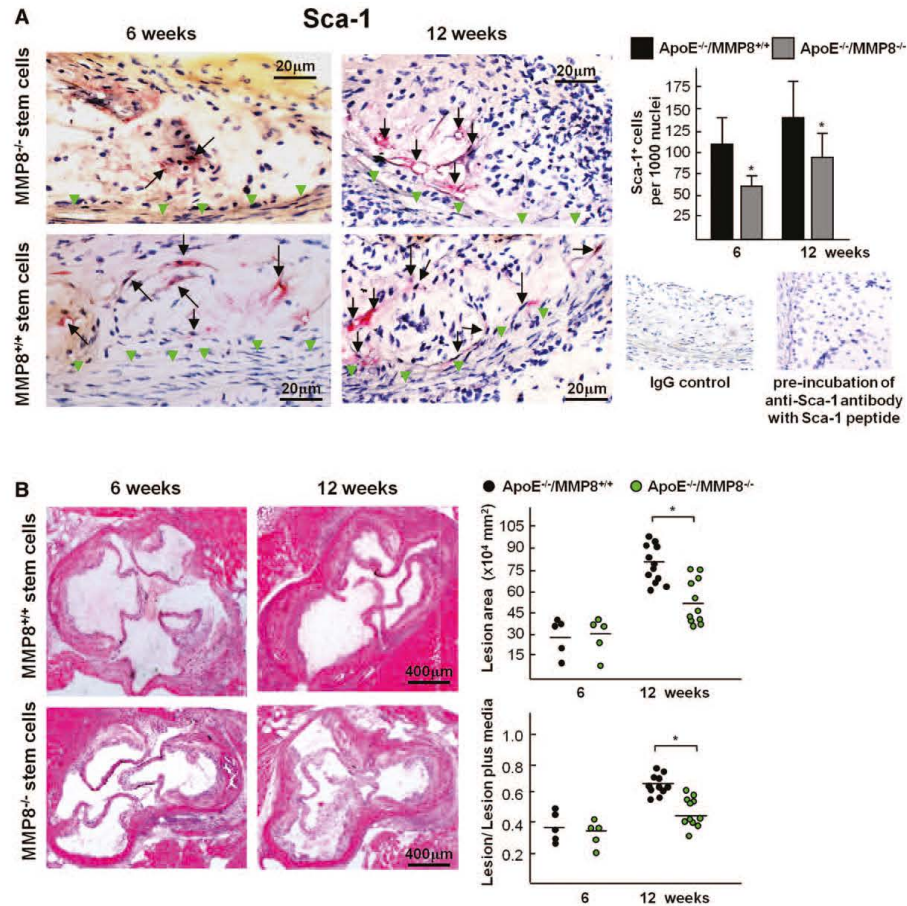


Figure 7. Matrix metalloproteinase (MMP8) deficiency reduces stem/progenitor cell (SPC) recruitment and accumulation in atherosclerotic lesions in vivo. ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice were injected with SPCs (1×10^5) isolated from the bone marrow of ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} or ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice and fed a Western diet for 6 or 12 weeks. Aortic roots from the recipient mice were harvested, sectioned, and subjected to immunohistochemical staining with an antibody against the stem cell marker Sca-1 (A) or hematoxylin and eosin staining (B). **A**, MMP8 deficiency reduces SPC accumulation in atherosclerotic lesions. Shown in the figure are representative images of immunohistochemical staining for Sca-1 and diagrammatic representation of quantitative data of Sca-1-positive cells in atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice injected with SPCs from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} and ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice, respectively. **Black arrows** indicate Sca-1-positive cells in the lesions. **Green arrowheads** indicate the boundary between the lesion and healthy area. Also shown in the figure are representative staining images from IgG control or preincubation of Sca-1 antibody with a Sca-1 peptide. **B**, MMP8 deficiency results in smaller atherosclerotic lesions. Shown in the figure are representative images of hematoxylin and eosin staining and diagrammatic representation of quantitative data of the atherosclerotic lesions of aortic roots of ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice injected with SPCs isolated from the bone marrow of ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+} or ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice, respectively (black lines represent mean values in each group).

with an antibody specifically against E-cadherin ectodomain showed an increase in the amount of E-cadherin ectodomain on embryonic Sca-1⁺ SPCs when infected with MMP8 shRNA or incubated with the ADAM10 inhibitor GI254023X (Figure 6C), whereas Western blot analysis showed a reduction in the amount of soluble E-cadherin in the culture supernatants (Figure 6A2).

Previous studies indicated that soluble E-cadherin could disrupt cell-cell adhesion and induce epithelial and cancer cell migration/invasion into collagen I gel.^{32,33} Because we had

observed that MMP8 knockdown led to a reduction in soluble E-cadherin generation from Sca-1⁺ SPCs, we investigated whether this could have an effect on SPC migration. We found that the decrease in migratory ability of embryonic Sca-1⁺ SPCs infected with MMP8 shRNA was significantly reduced in the presence of supernatant from cultures of embryonic Sca-1⁺ SPCs infected with nontarget shRNA (Figure 6D). Furthermore, we found that this rescuing effect of supernatant from cultures of Sca-1⁺ SPCs infected with nontarget shRNA was abolished if an antibody against soluble E-cadherin had

been added to the supernatant to immunoprecipitate soluble E-cadherin (Figure 6D), suggesting that E-cadherin shedding, probably mediated by ADAM10, contributes to the effect of MMP8 on SPC migration.

To investigate whether MMP8 deficiency could have an effect on the level of soluble E-cadherin *in vivo*, we measured the plasma levels of soluble E-cadherin in mice with or without MMP8 knockout fed a Western diet for 12 weeks. We found that the plasma level of soluble E-cadherin was significantly lower in MMP8 knockout mice (226 ± 261 vs 1850 ± 2753 ng/mL; $P < 0.01$; $n = 5$ per each group).

MMP8 Deficiency Reduces SPC Recruitment and Accumulation in Atherosclerotic Lesions *In Vivo*

Having found that MMP8 played an important role in SPC migration and recruitment *in ex vivo* and *in vitro* experiments, we further examined the *in vivo* effects of MMP8 on SPC migration and recruitment into atherosclerotic lesions and on lesion formation and progression. To this end, we injected ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice with SPCs isolated from the bone marrow of either green fluorescence protein (GFP) transgenic or ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} or ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice and fed the recipient mice a Western diet. In these experiments, MMP8-deficient mice were chosen as recipients to exclude the effects of other cellular source of MMP8 on SPC migration and recruitment into atherosclerotic lesions. MagCelect Mouse Hematopoietic Cell Lineage Depletion Kit (MAGM209, R&D System), rather than single stem cell marker-positive selection, was used to isolate bone marrow SPCs for injection, because SPCs in atherosclerotic lesions are known to be heterogeneous and because no single stem cell marker can capture the entire SPC population. The suitability of using this method was confirmed by the finding that $\approx 90\%$ of cells isolated using this kit were c-kit and CD34 single- or double-positive (Online Figure VI), and $\approx 27\%$ of the c-kit/CD34 double-negative cells also were positive for another stem cell marker, Sca-1 (Online Figure VI).

In ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice injected with SPCs isolated from the bone marrow of GFP transgenic mice and fed a Western diet for 12 weeks, we verified that injected SPCs (containing GFP as a marker) were recruited into and accumulated in atherosclerotic lesions (Online Figure VIIIB), and we found that they were present also in the bone marrow, peripheral blood, thymus, spleen, liver, and lung (Online Figure VIA) but undetectable in the brain, kidneys, and skeletal muscles (data not shown). We found that the majority of GFP-positive cells in atherosclerotic lesions expressed the hematopoietic cell marker CD45 (35%) or the macrophage marker CD68 (29%; Online Figure VIIIB), and some expressed the earlier SMC marker smooth muscle actin (5%; Online Figure VIIIB) or the endothelial cell marker CD31 ($< 1\%$, data not shown), but none of them expressed smooth muscle myosin heavy chain, a marker for mature SMCs (Online Figure VIIIB), indicating that the injected SPCs recruited into atherosclerotic lesions differentiate mainly into leukocytes/macrophages.

In ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice injected with SPCs isolated from the bone marrow of either ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} or ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice and fed a Western diet for 6 or 12 weeks, we found that compared with the atherosclerotic lesions in

those mice injected with SPCs isolated from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice, the atherosclerotic lesions in those mice injected with MMP8-deficient SPCs (ie, isolated from ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice) contained significantly fewer cells that were positive for Sca-1 (Figure 7A), c-kit (Online Figure VIIIA), CD45 (Online Figure VIIIB), or CD68 (Online Figure VIIIC), and had a trend toward fewer smooth muscle actin-positive cells (Online Supplement Figure VIID), supporting that MMP8 plays an important role in SPC recruitment into and accumulation in atherosclerotic lesions *in vivo*. Furthermore, we found that at 12 weeks postinjection, the atherosclerotic lesions in the aortic roots of the mice injected with MMP8-deficient SPCs were significantly smaller than the atherosclerotic lesions in those mice injected with SPCs from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice (Figure 7B), further supporting an important role of MMP8 in SPCs in atherosclerotic lesion formation.

Discussion

Monocytes/macrophages and SMCs represent 2 major cell types in atherosclerotic lesions and play central roles in lesion formation and progression.¹ There is substantial evidence indicating that a proportion of SMCs in atherosclerotic lesions are derived from smooth muscle progenitor cells originally residing in the arterial adventitia.²⁻⁵ There is also emerging evidence suggesting that a proportion of macrophages in atherosclerotic lesions are derived from hematopoietic SPCs, which might originate from the bone marrow and are recruited via the blood circulation into atherosclerotic lesions.⁶⁻¹⁰ In agreement, our study shows the presence of SPCs in atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice fed a Western diet can induce atherosclerosis. Because SPCs are heterogeneous and no single marker can be used to capture the various types,^{34,35} we used a panel of well-documented markers (CD34, Sca-1, c-kit, and Flk-1) to detect SPCs in atherosclerotic lesions in this study.

More importantly, results of our study indicate that MMP8 plays an important role in SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions. We first found that compared with atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice, those in ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice contained fewer SPCs (CD34, Sca-1, c-kit, and Flk-1-positive cells). To specifically test the importance of MMP8 in SPCs for the SPC recruitment into atherosclerotic lesions and for lesion formation, we injected ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice with SPCs from bone marrows of GFP transgenic or ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} or ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice and fed the injected mice a Western diet. The experiment with SPCs isolated from GFP transgenic cells showed that at 12 weeks postinjection, bone marrows of the recipient mice contained GFP-positive SPCs, suggesting that the injected SPCs had been incorporated into the bone marrow. It also showed that atherosclerotic lesions in the recipient mice contained GFP-positive SPCs, most of which expressed markers of hematopoietic cells and macrophages, indicating that SPCs had been recruited into atherosclerotic lesions and differentiated into leukocytes/macrophages. The experiment with injection of SPCs from ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} or ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice showed that atherosclerotic lesions in recipient mice injected with SPCs from ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice contained fewer SPCs and were smaller than atherosclerotic lesions in mice injected with SPCs from ApoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice, corroborating

that MMP8 from SPCs is important for SPC recruitment to atherosclerotic lesions and for lesion development. Further to these findings, our *ex vivo* experiments on aorta explants demonstrated that the presence of MMP8 enhanced SPC migration from the arterial lumen and the adventitia into atherosclerotic lesions, whereas *in vitro* experiments showed that the presence of MMP8 increased the ability of SPCs to migrate across the endothelium or through extracellular matrix. Together, these *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* findings indicate that MMP8 in SPCs plays an important role in SPC migration, which facilitates their recruitment into atherosclerotic lesions and increases lesion development.

Cell migration involves dissociation of the migrating cells from the extracellular matrix and degradation of extracellular matrix proteins in the migratory path. Our study shows that the presence of MMP8 inhibits SPC adhesion to extracellular matrix and enhances SPC migration through extracellular matrix proteins, particularly collagen I, the principal substrate of MMP8¹⁹ and the major constituent of the interstitial matrix of the arterial wall.²⁶ This provides a likely mechanistic explanation for the role of MMP8 in SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions.

SPC migration also entails disruption of their interactions with each other and with stromal cells, allowing them to be released from stem cell niches in, for example, the arterial adventitia.^{2–5} The cell adhesion molecule E-cadherin, which is highly expressed in SPCs as shown in previous studies^{37,38} and in our present study, mediates cell–cell adhesion by the formation of homodimers of the ectodomain of E-cadherin on adjacent cells.^{31,39} Soluble E-cadherin generated by E-cadherin ectodomain shedding from the cell surface, however, can disrupt cell–cell adhesion and induce cell migration.^{32,33} Results of our study indicate that MMP8 can promote SPC migration by indirectly (probably via ADAM10) or directly increasing E-cadherin ectodomain shedding and soluble E-cadherin generation, providing another likely mechanistic explanation for the role of MMP8 in SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions. A previous study shows that ADAM10 can shed E-cadherin on epithelial cells, thereby reducing E-cadherin–mediated cell–cell adhesion and promoting epithelial cell migration.³¹ In this study, we found that MMP8 depletion reduced the amount of mature ADAM10 on SPCs and that knockdown of MMP8 and the presence of the ADAM10-specific inhibitor GI254023X^{27,28} resulted in reduced E-cadherin shedding on SPCs. In addition, we found that soluble E-cadherin levels in the plasma were decreased in MMP8 knockout mice. Furthermore, results of *in vitro* experiments indicate that soluble E-cadherin in SPC culture supernatant increased migration of SPCs with MMP8 knockdown. Therefore, it seems that future work to generate MMP8/ADAM10 and MMP8/E-cadherin double-knockout mice and to further characterize these effects would be warranted.

Some ADAMs, including ADAM10, when activated, possess proteolytic activity.^{40,41} Their activation often involves the removal of their prodomain.^{40,41} Although prodomain removal often occurs intracellularly, there is evidence indicating that the cell surface also contains pro-ADAMs (containing

the prodomain) whose maturation (prodomain removal) can potentially take place extracellularly.^{41–44} The results of the Western blot, immunocytochemical, and flow cytometry analyses of our study suggest the presence of pro-ADAM10 on Sca-1⁺ SPC surface and that the presence of MMP8 reduces the amount of pro-ADAM10 and increases the amount of mature ADAM10 on these cells. Our *in vitro* assays showed that incubation of a recombinant mouse ADAM10 (amino acid residues 19–673, consisting of the prodomain and the other ectodomains) with active MMP8 resulted in the generation of cleaved ADAM10 products detectable by an antibody against the ADAM10 prohormone convertase cleavage site (amino acid residues 157–221) in Western blot analysis. Although the exact cleavage sites are unknown and further studies are warranted, our data suggest that MMP8 can cleave ADAM10, which could potentially explain the finding of our study that the presence of MMP8 reduces pro-ADAM10 and increases mature ADAM10 on Sca-1⁺ SPCs.

Our recent study showed that MMP8 deficiency reduces atherosclerotic lesion formation in ApoE knockout mice fed a Western diet, with reduced lesional macrophage and SMC content,²⁶ indicating a causal role of MMP8 in the pathogenesis of atherosclerosis. This previous study also revealed evidence indicating that the role of MMP8 in atherogenesis is partly attributable to an MMP8-mediated increase in angiotensin II generation, leading to increased blood pressure and increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 that plays an important role in leukocyte recruitment.¹ However, given the complexity of atherogenesis, and because MMP8 can potentially cleave multiple types of proteins with different functions, it is plausible that multiple mechanisms contribute to the role of MMP8 in atherogenesis. The finding of this study that MMP8 enhances SPC recruitment into atherosclerotic lesions indicates that this likely represents another mechanism for the role of MMP8 in atherogenesis. It is possible that reduced SPC recruitment into atherosclerotic lesions in MMP8-deficient mice is partly because of the reduced inflammatory surrounding and, therefore, attenuated chemotaxis of SPCs into the vascular wall. However, results of the *in vivo* experiments comparing MMP8-deficient mice injected with either MMP8-deficient SPCs or MMP8 wild-type SPCs indicate that MMP8 expression by SPCs themselves also plays an important role in their recruitment into atherosclerotic lesions.

In summary, our study shows that MMP8 plays a functional role in SPC migration and their recruitment into atherosclerotic lesions, and that MMP8 expression by SPCs contributes to atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice. The data from this study provide new insight into the biological molecules and related mechanisms involved in the regulation of SPC migration and in the pathogenesis of atherosclerosis.

Sources of Funding

The authors thank the support from the British Heart Foundation (PG/11/40/28891; PG/08/051/25141). Dr Xiao is the recipient of a British Heart Foundation Intermediate Basic Science Research Fellowship (FS/09/044/28007) and is the principal investigator of British Heart Foundation project grant (PG/11/40/28891). The work

forms part of the research themes contributing to the translational research portfolio of Barts Cardiovascular Biomedical Research Unit, which is supported and funded by the National Institutes of Health Research.

Disclosures

None.

References

- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868–874.
- Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:94–101.
- Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;113:1258–1265.
- Hu Y, Davison F, Ludewig B, Erdel M, Mayr M, Uhl M, Dietrich H, Xu Q. Smooth muscle cells in transplant atherosclerotic lesions are originated from recipients, but not bone marrow progenitor cells. *Circulation*. 2002;106:1834–1839.
- Hu Y, Mayr M, Metzler B, Erdel M, Davison F, Xu Q. Both donor and recipient origins of smooth muscle cells in vein graft atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2002;91:e13–e20.
- Zulli A, Buxton BF, Black MJ, Hare DL. CD34 Class III positive cells are present in atherosclerotic plaques of the rabbit model of atherosclerosis. *Histochem Cell Biol*. 2005;124:517–522.
- Zulli A, Buxton BF, Black MJ, Hare DL. Embryonic stem cells markers are present within rabbit atherosclerotic plaques. *Histol Histopathol*. 2008;23:741–746.
- Zulli A, Rai S, Buxton BF, Burrell LM, Hare DL. Co-localization of angiotensin-converting enzyme 2-, octomer-4- and CD34-positive cells in rabbit atherosclerotic plaques. *Exp Physiol*. 2008;93:564–569.
- Febbraio M, Guy E, Silverstein RL. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2333–2338.
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergün S. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*. 2006;133:1543–1551.
- Torsney E, Hu Y, Xu Q. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15:64–68.
- Torsney E, Mandal K, Halliday A, Jahangiri M, Xu Q. Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels. *Atherosclerosis*. 2007;191:259–264.
- Xiao Q, Ye S, Oberholzer F, Mayr A, Jahangiri M, Willeit J, Kiechl S, Xu Q. SDF1 gene variation is associated with circulating SDF1alpha level and endothelial progenitor cell number: the Bruneck Study. *PLoS ONE*. 2008;3:e4061.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:221–233.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370–1376.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625–637.
- Iwakura A, Shastri S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006;113:1605–1614.
- Vagima Y, Avigdor A, Goichberg P, et al. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. *J Clin Invest*. 2009;119:492–503.
- Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17:217–223.
- Van Den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokine human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem*. 2003;270:3739–3749.
- Cox JH, Dean RA, Roberts CR, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. *J Biol Chem*. 2008;283:19389–19399.
- Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol*. 2004;172:7791–7803.
- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001;104:1899–1904.
- Turk MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, Alvarez-Sabin J, Cairoli M, Badimon L. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis*. 2006;187:161–169.
- Tuomainen AM, Nyyssönen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen TP, Salonen JT, Sorsa T, Pussinen PJ. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2722–2728.
- Laxton RC, Hu Y, Duchene J, et al. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res*. 2009;105:921–929.
- Hundhausen C, Miszela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 2003;102:1186–1195.
- Hoettecke N, Ludwig A, Foro S, Schmidt B. Improved synthesis of ADAM10 inhibitor GI254023X. *Neurodegener Dis*. 2010;7:232–238.
- Xiao Q, Zeng L, Zhang Z, Margariti A, Ali ZA, Channon KM, Xu Q, Hu Y. Sca-1+ progenitors derived from embryonic stem cells differentiate into endothelial cells capable of vascular repair after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2244–2251.
- Xiao Q, Zeng L, Zhang Z, Hu Y, Xu Q. Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin alpha1/beta1/alpha5 and PDGF receptor pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C342–C352.
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9182–9187.
- Wheelock MJ, Buck CA, Bechtel KB, Damsky CH. Soluble 80-kD fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem*. 1987;34:187–202.
- Ryniers F, Stove C, Goethals M, Brackener L, Noë V, Bracke M, Vandekerckhove J, Mareel M, Bruyneel E. Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. *Biol Chem*. 2002;383:159–165.
- Yoder MC, Ingram DA. Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. *Curr Opin Hematol*. 2009;16:269–273.
- Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*. 2007;21:1141–1149.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355–1374.
- Ueberham E, Aigner T, Ueberham U, Gebhardt R. E-cadherin as a reliable cell surface marker for the identification of liver specific stem cells. *J Mol Histol*. 2007;38:359–368.
- Soncin F, Mohamet L, Eckardt D, Ritson S, Eastham AM, Bobola N, Russell A, Davies S, Kemler R, Merry CL, Ward CM. Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. *Stem Cells*. 2009;27:2069–2080.
- Turel KR, Rao SG. Expression of the cell adhesion molecule E-cadherin by the human bone marrow stromal cells and its probable role in CD34(+) stem cell adhesion. *Cell Biol Int*. 1998;22:641–648.

Downloaded from <http://circres.ahajournals.org/> at Queen Mary, University of London on March 12, 2013

40. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 2003;17:7–30.
41. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008;29:258–289.
42. Lum L, Reid MS, Blobel CP. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem.* 1998;273:26236–26247.
43. Mayer G, Hamelin J, Asselin MC, Pasquato A, Marcinkiewicz E, Tang M, Tabibzadeh S, Seidah NG. The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *J Biol Chem.* 2008;283:2373–2384.
44. Charrier L, Yan Y, Driss A, Laboisse CL, Sitaraman SV, Merlin D. ADAM-15 inhibits wound healing in human intestinal epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G346–G353.

Novelty and Significance

What Is Known?

- Atherosclerotic lesions contain cells derived from stem/progenitor cells (SPCs).
- Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockout reduces atherosclerosis in a mouse model.

What New Information Does This Article Contribute?

- MMP8 plays an important role in SPC migration and recruitment into atherosclerotic lesions.
- This contributes to atherosclerotic lesion progression.

Although previous research indicates that atherosclerotic lesions contain SPCs, and that these cells contribute to lesion formation and progression, the mechanisms by which they are recruited have remained incompletely understood. Because SPC migration requires degradation of proteins on the cell surface and the extracellular

matrix, we investigated whether the protease MMP8 plays a role in SPC migration and their recruitment into atheromas. In a well-established mouse model, we observed that deletion of MMP8 reduced SPC levels in atherosclerotic lesions. We found that MMP8-null mice had development of larger atherosclerotic lesions if they had been injected with SPCs that expressed MMP8 compared with MMP8 knockout mice injected with MMP8-deficient SPCs. Furthermore, we found that MMP8-deficient SPCs had reduced ability to migrate across the endothelium, or through extracellular matrix (Matrigel or collagen I), or into atherosclerotic lesions from the arterial lumen or the adventitia. Our studies also indicate that the enhancing effect of MMP8 on SPC migration is partly because of its ability to degrade collagen I and to cleave α -disintegrin-and-metalloproteinase-domain-10, which in turn cleaves the cell surface protein E-cadherin. These novel findings contribute to our understanding of atherogenesis and may facilitate further translational stem cell research in this area.

3.1. Matrix-Metalloprotease-8 fördert die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen und die Ausbildung von Neointima

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:²⁹²

Autoren: Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Gianluca Grassia, Yanhua Hu, Zhongyi Zhang, Qiuru Xing, Xiaoke Yin, Marcella Maddaluno, Binia Drung, Boris Schmidt, Pasquale Maffia, Armando Ialenti, Manuel Mayr, Qingbo Xu, Shu Ye.
Titel: „Matrix Metalloproteinase-8 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation“.
Journal: Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, **2014**, 34, 90-98.
DOI: 10.1161/atvbaha.113.301418.

Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins ©.

Zusammenfassung:

In dieser Veröffentlichung wurde die Funktion von MMP8 in der Bildung von Neointima nach Gefäßschädigungen sowie dessen Effekt in der Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMCs) untersucht. Die Migration und Proliferation von VSMCs ist ein Schlüsselschritt in der Bildung von Neointima, welche eine Restenose nach durchgeführter Angioplasti verursachen kann.

Eine initiierte Beschädigung der Halsschlagader in einem etablierten, vermehrt Atherosklerose-bildenden Mausmodel (ApoE^{-/-}) führte bei MMP *knockout* (MMP8^{-/-}) zu weniger Zellproliferation in Neointima-Läsionen und einer geringeren Größe dieser Läsionen. Immunfärbungen der verletzten Arterien zeigten eine Zunahme an MMP8 in den MMP-Wildtyp-Mäusen (ApoE^{-/-}/MMP8^{+/+}) während der Neointima-Bildung.

Ein Vergleich der Proliferation und Migration von VSMCs mit und ohne MMP8-Expressionsfähigkeit bestätigte, dass MMP8 beide Vorgänge beeinflusst. *Knockout* des Proteins verursacht eine signifikant geringere Proliferationsrate und reduziert die Migrationsfähigkeit.

Um genauere Informationen über die molekularen Mechanismen der von MMP8 regulierten VSMC-Proliferation und -Migration zu erhalten, wurde eine quantitative Proteomanalyse durchgeführt. Dabei wurden sechs Proteine detektiert, die in MMP8 *knockout* gegenüber MMP8-Wildtyp VSMC-Medium deutlich unterschiedliche Konzentrationen aufweisen. Darunter ADAM10, welches bereits mit Zellproliferation und Migration im Cadherin-β-Catenin Metabolismus in Verbindung gebracht wurde. Im VSMC-Medium mit MPP8 wurden im

Vergleich zu MMP8 *knockout* erhöhte Konzentrationen an ADAM10 gemessen, während in den MMP8^{-/-}-Proben mehr pro-ADAM10 vorlag. Dieses legt die Vermutung nahe, dass MMP8 in die pro-ADAM-Spaltung involviert ist.

Durch Inhibition von ADAM10 mit dem bekannten Inhibitor GI254023X **91** wurden Proliferation und Migration in MMP^{+/+}-VSCMs vermindert, im Gegensatz hierzu tritt dieser Effekt nicht bei MMP8 *knockout*-Zellen auf.

Basierend auf der Spaltung von N-Cadherin von der Zelloberfläche und dem Cadherin-β-Catenin-Komplex durch ADAM10 kann die Proliferation von VSCMs ausgelöst werden. Dieses konnte hier bestätigt und in Verbindung zur MMP8-Expression gestellt werden. MMP8 beeinflusst, vermittelt durch ADAM10, sowohl die Spaltung von N-Cadherin als auch die β-Catenin Signalgebung.

Zusätzlich konnte durch immunhistologische Untersuchungen die Kolokalisation von ADAM10 mit VSMCs und N-Cadherin sowie die Häufung von β-Catenin in der Neointima in ApoE^{-/-}/MMP8^{-/-}-Mäusen aufgedeckt werden.

Insgesamt wurde demonstriert, dass MMP8 die Proliferation von VSMCs durch einen ADAM10-, N-Cadherin-, β-Catenin-vermittelnden Mechanismus erhöht und eine wichtige Funktion in der Neointima-Bildung einnimmt.

Synthetischer Beitrag zur Arbeit: GI254023X **91** (+ siehe Kapitel 3.3.1).

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Matrix Metalloproteinase-8 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation

Qingzhong Xiao, Feng Zhang, Gianluca Grassia, Yanhua Hu, Zhongyi Zhang, Qiuru Xing, Xiaoke Yin, Marcella Maddaluno, Binia Drung, Boris Schmidt, Pasquale Maffia, Armando Ialenti, Manuel Mayr, Qingbo Xu and Shu Ye

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:90-98; originally published online October 24, 2013;
doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301418

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2013 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/34/1/90>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/atvbaha/suppl/2013/10/24/ATVBAHA.113.301418.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at University of Calgary on July 10, 2014

Matrix Metalloproteinase-8 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation

Qingzhong Xiao,* Feng Zhang,* Gianluca Grassia, Yanhua Hu, Zhongyi Zhang, Qiuru Xing, Xiaoke Yin, Marcella Maddaluno, Binia Drung, Boris Schmidt, Pasquale Maffia, Armando Ialenti, Manuel Mayr, Qingbo Xu, Shu Ye

Objective—We investigated the role of matrix metalloproteinase-8 (MMP8) in neointima formation and in vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation.

Approach and Results—After carotid artery wire injuring, MMP8^{-/-}/apoE^{-/-} mice had fewer proliferating cells in neointimal lesions and smaller lesion sizes. Ex vivo assays comparing VSMCs isolated from MMP8 knockout and wild-type mice showed that MMP8 knockout decreased proliferation and migration. Proteomics analysis revealed that a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) had lower concentrations in MMP8 knockout VSMC culture media than in MMP8 wild-type VSMC culture media. Western blot, flow cytometric, and immunocytochemical analyses showed that MMP8 knockout VSMCs contained more pro-ADAM10 but less mature ADAM10, more N-cadherin, and β -catenin in the plasma membrane but less β -catenin in the nucleus and less cyclin D1. Treatment of MMP8 wild-type VSMCs with an ADAM10 inhibitor, GI254023X, or siRNA knockdown of ADAM10 in MMP8 wild-type VSMCs inhibited proliferation and migration, increased N-cadherin and β -catenin in the plasma membrane, reduced β -catenin in the nucleus, and decreased cyclin D1 expression. Incubation of MMP8 knockout VSMCs with a recombinant ADAM10 rescued the proliferative and migratory ability of MMP8 knockout VSMCs and increased cyclin D1 expression. Furthermore, immunohistochemical analyses showed colocalization of ADAM10 with VSMCs and N-cadherin, and nuclear accumulation of β -catenin in the neointima in apoE^{-/-}/MMP8^{+/-} mice.

Conclusions—MMP8 enhances VSMC proliferation via an ADAM10, N-cadherin, and β -catenin-mediated pathway and plays an important role in neointima formation. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:90-98.)

Key Words: matrix metalloproteinase-8 ■ myocytes, smooth muscle ■ neointima

The pathogenesis of postangioplasty restenosis involves migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), which constitute a major component of postangioplasty neointimal lesions.¹⁻⁴ VSMC migration and proliferation are regulated by growth factors, adhesion molecules, proteases, and intracellular proteins. Among them, the cadherin- β -catenin complex and its cognate intracellular pathway have been increasingly appreciated as important regulators of these processes.⁵⁻⁸

Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) was once thought to be produced exclusively by polymorphonuclear leukocytes, but more recent studies have shown that various other cell types including stem/progenitor cells express this protease.⁹ Compared with some other members of the MMP family, MMP8 has been less investigated for its proteolytic substrates and biological

roles. Herman et al¹⁰ were the first to reveal that VSMCs, endothelial cells, and macrophages in atherosclerotic plaques express MMP8. Subsequently other investigators showed a correlation between increased MMP8 expression and rapid atherosclerotic lesion progression.^{11,12} A causal role of MMP8 in atherosclerosis development was demonstrated by our recent study, which showed that in apolipoprotein E (apoE)-deficient mice fed a Western diet for 12 weeks, MMP8 knockout resulted in a significant reduction of atherosclerotic lesions with decreased macrophage and VSMC contents.¹³ The study also revealed a role of MMP8 in vascular recruitment of leukocytes,¹³ providing a mechanistic explanation for the effect of MMP8 knockout on macrophage content in atherosclerotic lesions.

In the present study, we sought to investigate whether MMP8 also plays a role in neointima formation after vessel

Received on: April 16, 2012; final version accepted on: October 10, 2013.

From William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, London, United Kingdom (Q. Xiao, F.Z., S.Y.); Department of Cardiology, Peking University People's Hospital, Beijing, China (F.Z.); Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Naples, Italy (G.G., M. Maddaluno, P.M., A.I.); Cardiovascular Division, King's College London BHF Centre, London, United Kingdom (Y.H., Z.Z., Q. Xing, X.Y., M. Mayr, Q. Xu); Clemens Schöpf Institute, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Germany (B.D., B.S.); Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom (P.M.).

*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.113.301418/-DC1>.

Correspondence to Shu Ye, MD, PhD, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, John Vane Science Bldg, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, United Kingdom. E-mail s.ye@qmul.ac.uk
© 2013 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301418

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at University of Calgary on July 10, 2014

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
ADAM10	a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
MMP8	matrix metalloproteinase-8
VSMC	vascular smooth muscle cell
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1

injury and its effect on VSMC migration and proliferation, which are key processes in neointima formation.

Materials and Methods

Materials and Methods are available in the online-only Supplement.

Results

Impact of MMP8 on Cell Proliferation and Neointima Formation After Vessel Injury

To investigate whether MMP8 played a role in neointima formation, we used an established *in vivo* vascular injury model in which the endothelium of a segment of the carotid artery is removed with the use of a wire.¹⁴⁻¹⁶ The study showed that at day 28, neointimal lesions in MMP8 knockout mice were significantly smaller than those in MMP8 wild-type mice (Figure 1A). We also examined cell proliferation in the injured carotid arteries at days 7 and 28, and found that there were significantly fewer proliferating cells in injured carotid arteries in

MMP8 knockout mice than in MMP8 wild-type mice at day 7 ($5.3 \pm 0.6\%$ [$n=9$] versus $11.9 \pm 1.0\%$ [$n=9$]; $P<0.01$) as well as at day 28 ($10.2 \pm 1.8\%$ [$n=7$] versus $20.2 \pm 2.1\%$ [$n=8$]; $P<0.01$; Figure 1B). Moreover, the number of neointimal VSMCs was significantly reduced in MMP8^{-/-}/apoE^{-/-} mice compared with MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} mice (63.8 ± 5.7 [$n=10$] versus 117.7 ± 18.6 [$n=7$], respectively; $P<0.05$) without significant differences in the cellular density (number of VSMCs/mm²; 574.8 ± 131.4 [$n=10$] versus 479.1 ± 129.4 [$n=7$]). Immunostaining of the injured arteries showed an increase in MMP8 protein in the MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} mice during neointima formation (Figure 1 in the online-only Data Supplement).

Effect of MMP8 on Ex Vivo VSMC Proliferation and Migration

To verify that MMP8 has a positive effect on VSMC proliferation, we compared the rates of proliferation of cultured VSMCs isolated from aortas of MMP8 knockout and wild-type mice. Immunocytochemical staining and immunoblotting confirmed that cultured VSMCs from MMP8 wild-type mice expressed MMP8, whereas VSMCs from MMP8 knockout mice did not (Figure 2A and 2B). Proliferation assays showed that MMP8 knockout VSMCs had a significantly lower rate of proliferation than MMP8 wild-type VSMCs (Figure 2C). In agreement, immunostaining for the proliferation marker Ki-67 showed that the percentage of Ki-67 positive cells was significantly lower among MMP8

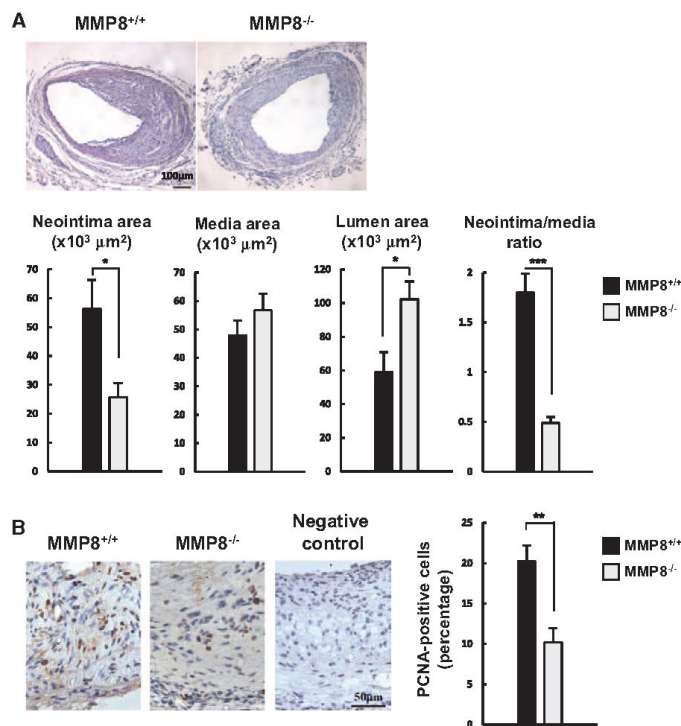


Figure 1. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockout reduces neointima formation and cell proliferation. The endothelium of the left common carotid artery of MMP8^{-/-}/apoE^{-/-} and MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} mice was damaged by passing a 0.35-mm-diameter flexible nylon wire through the lumen of the artery 3 times. Carotid arteries were collected 28 days after wire injury and sectioned and subjected to hematoxylin/eosin staining or immunostaining with an antibody against the proliferation marker proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **A**, Representative photomicrographs of hematoxylin/eosin staining at day 28 postinjury, and column charts showing quantitative data (means \pm SEM) of neointima areas, media areas, lumen areas, and neointima/media ratio, respectively ($n=7$ for MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} and $n=10$ for MMP8^{-/-}/apoE^{-/-}). **B**, Representative photomicrographs of PCNA staining at day 28 postinjury, and column chart showing percentages (\pm SEM) of neointimal and medial PCNA-positive cells ($n=8$ for MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} and $n=7$ for MMP8^{-/-}/apoE^{-/-}). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

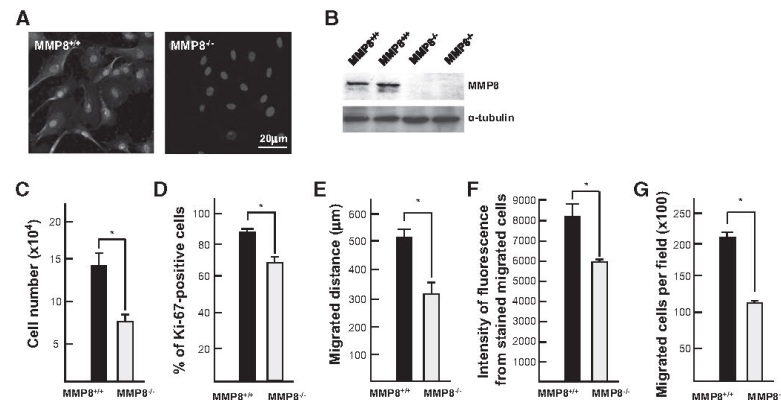


Figure 2. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockout impairs vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration. VSMCs were isolated from aortas of MMP8^{-/-}/apoE^{-/-} and MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} mice. Cells were subjected to immunofluorescent staining (A) and immunoblot analysis (B), both with an antibody against MMP8. C, Cells were cultured on 6-well plates (50 000 cells/well) for 4 days, harvested and counted; the column chart shows the means (±SEM) of cell counts in 4 independent experiments. D, Cells were subjected to immunofluorescent staining for nuclei using 4',6-diamidino-2-phenylindole and for the proliferation marker Ki-67 using a Ki-67 antibody; the column chart shows the means (±SEM) of Ki-67-positive cells in 4 independent experiments. E, Nearly confluent cells on 6-well plates were subjected to scratch wound healing assays; the column chart shows the means (±SEM) of migrated distance in 4 independent experiments. F, Cells were subjected to Boyden chamber invasion assays with fluorescent staining and quantification of migrated cells; the column chart shows the means (±SEM) of fluorescent intensity in 4 experiments. G, Cells (50 000 cells/insert) were subjected to migration assays and quantification of numbers of migrated cells; the column chart shows the means (±SEM) in 4 experiments. **P*<0.05.

knockout VSMCs than that among MMP8 wild-type VSMCs (Figure 2D). In contrast, no significant difference was observed in terms of cell apoptosis between MMP8 wild-type and knockout VSMCs (data not shown).

To investigate whether MMP8 had an effect on VSMC migration, we performed in vitro scratch wound healing assays and Boyden chamber invasion assays on cultured VSMCs. The assays showed that compared with MMP8 wild-type VSMCs, MMP8 knockout VSMCs had significantly reduced migratory ability (Figure 2E–2G).

Proteomic Analysis of MMP8 Knockout and Wild-Type VSMC-Conditioned Culture Media

To investigate into molecular pathways involved in MMP8 regulation of VSMC proliferation and migration, we performed a mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis on MMP8 knockout and wild-type VSMC-conditioned culture

media. The assay detected 6 secreted/membrane proteins whose concentrations significantly differed in MMP8 knockout versus MMP8 wild-type VSMC-conditioned media (Table 1). Among these proteins, a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) is of particular interest because there has been evidence indicating that it can promote cell proliferation and migration via the cadherin-β-catenin pathway.^{17–27} ADAM10 has several structural domains including a signal peptide, a propeptide domain, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, a cysteine-rich domain, a transmembrane domain, and a cytoplasmic domain.²⁸ The propeptide domain is cleaved off during ADAM10 maturation and activation.^{28–31} In the proteomics analysis, we found that MMP8 wild-type VSMC-conditioned media had significantly higher concentrations of propeptide domain fragments than MMP8 knockout VSMC-conditioned media (Table 2). In addition, we detected

Table 1. Secreted/Membrane Proteins Whose Concentrations Significantly Differed in MMP8 Wild-Type and Knockout VSMC-Conditioned Media

UniProt ID	Protein Name	MW, kDa	<i>t</i> Test (<i>P</i> Value)	Normalized Spectra Count	
				WT (n=4)	KO (n=4)
ADA10_MOUSE	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	84	0.028	3.7±2.4	0.2±0.5
ATL2_MOUSE	ADAMTS-like protein 2	106	0.00096	0	1.4±0.5
CGRE1_MOUSE	Cell growth regulator with EF hand domain protein 1	31	0.027	2.3±0.9	0.5±0.9
CO5A2_MOUSE	Collagen α-2(V) chain	145	0.039	74.5±29.3	32.5±12.6
RISC_MOUSE	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	51	0.027	1.5±1.0	0
SSPO_MOUSE	SCO-spondin	535	0.04	0	1.6±1.3

KO indicates knockout; MMP8, Matrix Metalloproteinase-8; MW, molecular weight; VSMC, vascular smooth muscle cell; and WT, wild type.

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at University of Calgary on July 10, 2014

Table 2. ADAM10 Fragments Detected by Mass Spectrometry in MMP8 Wild-Type and Knockout VSMC-Conditioned Media

Amino Acid Sequences of ADAM10 Fragments Detected	Index	Domain	Times Detected* in MMP8 Wild-Type VSMC-Conditioned Media (n=4)	Times Detected* in MMP8 Knockout VSMC-Conditioned Media (n=4)
GGTFYIEPAER	132–142	Propeptide	+++++++	+
YGPQGGCADHSVFER	167–181	Propeptide	++	–
AIDTIYQTDFSGIR	253–267	Metalloproteinase	+	–
MAPSTCASTGSLQWSK	603–618	Cysteine rich	+	–
TITLQPGSPCNDFR	624–637	Cysteine rich	+	–

ADAM10 indicates a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10; and VSMC, vascular smooth muscle cell.

*Peptides with SEQUEST Xcorr scores >2 were counted.

fragments of other ectodomains of ADAM10 in MMP8 wild-type VSMC-conditioned media but not in MMP8 knockout VSMC-conditioned media (Table 2).

Effect of MMP8 on ADAM10

Immunoblot analysis confirmed that MMP8 wild-type VSMC-conditioned media had significantly higher concentrations of ADAM10 propeptide than MMP8 knockout VSMC-conditioned media (Figure 3A), suggesting the possibility of an effect of MMP8 on ADAM10 propeptide domain cleavage. Therefore, we investigated whether there was a difference in the amount of mature ADAM10 (lacking the propeptide domain) versus the amount of pro-ADAM10 (full length, containing the propeptide domain) in MMP8 knockout and wild-type VSMCs. Immunoblot

analysis showed that the amount of mature ADAM10 versus the amount of pro-ADAM10 was indeed greater in MMP8 wild-type VSMC extracts than in MMP8 knockout VSMC extracts (Figure 3B). The total intensity of the pro-ADAM10 band plus mature ADAM10 band was similar between the MMP8 wild-type and knockout VSMC extracts (Figure 4B), suggesting that MMP8 knockout did not lead to a change in ADAM10 expression. In agreement, flow cytometric and immunocytochemical analyses with an antibody against the ADAM10 propeptide domain both showed greater signals on MMP8 knockout VSMCs than on MMP8 wild-type VSMCs (Figure 3C and 3D), consistent with the notion that MMP8 knockout VSMCs have larger amounts of unprocessed ADAM10 (containing the propeptide domain) than MMP8 wild-type VSMCs.

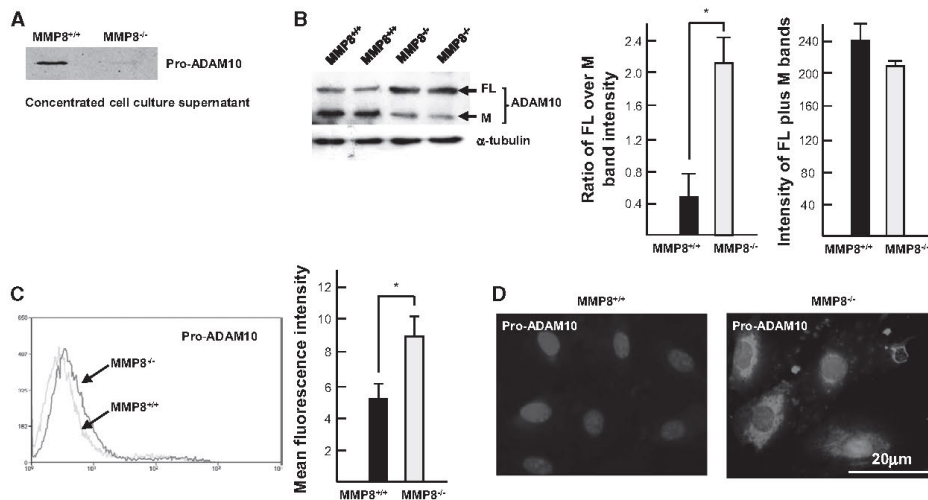


Figure 3. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockout reduces a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) propeptide domain cleavage. **A**, A representative image of immunoblot analysis of ADAM10 propeptide in MMP8 wild-type and knockout vascular smooth muscle cell (VSMC)-conditioned media, from 3 independent experiments. **B**, Immunoblot analysis of whole cell lysates from MMP8 wild-type and knockout VSMCs with antibodies against ADAM10 (cytoplasmic domain) or α -tubulin (as a protein loading control); the representative immunoblot image shows bands for full-length (FL) and mature (M) ADAM10, and the column charts show the means (\pm SEM; n=4) of the ratio of FL ADAM10 band intensity vs M ADAM10 band intensity (left) and the means (\pm SEM; n=4) of FL ADAM10 band intensity plus mature ADAM10 band intensity (right). **C**, Flow cytometric analysis of MMP8 wild-type and knockout VSMCs with an antibody against the ADAM10 propeptide domain; the column chart shows mean fluorescence intensity (\pm SEM) in 4 independent experiments. **D**, Representative images of immunofluorescent staining of MMP8 wild-type and knockout VSMCs with antibodies against the ADAM10 propeptide domain, from 3 independent experiments. * P <0.05.

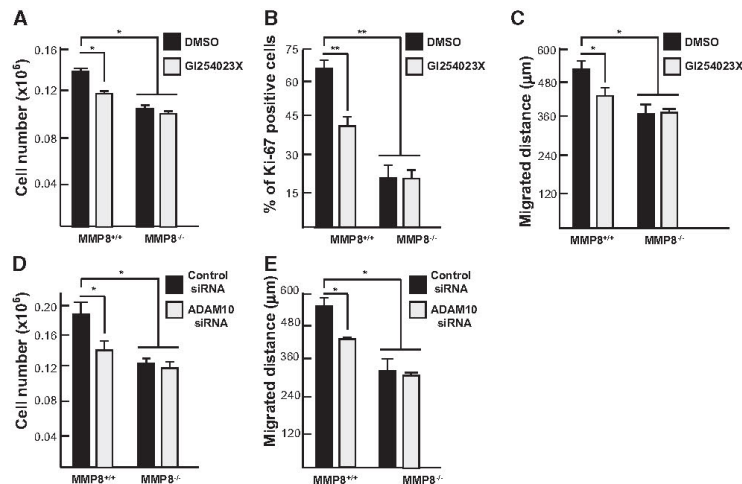


Figure 4. A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) inhibition reduces vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration. **A**, Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) wild-type and knockout VSMCs were cultured on 6-well plates (50 000 cells/well) in the presence of the ADAM10 specific inhibitor GI254023X (5 μmol/L) or the vehicle DMSO for 4 days, then harvested and counted; the column chart shows the means (±SEM) of cell counts in 4 independent experiments. **B**, MMP8 wild-type and knockout VSMCs were cultured in the presence of GI254023X or the vehicle DMSO for 48 hours and subjected to immunofluorescent staining with an antibody against the proliferation marker Ki-67; the column chart shows the means (±SEM) of percentages of Ki-67-positive cells in 4 independent experiments.

C, Nearly confluent MMP8 wild-type and knockout VSMCs cultured on 6-well plates in the presence of GI254023X or the vehicle DMSO were subjected to scratch wound healing assays; the column chart shows the means (±SEM) of migrated distance in 4 independent experiments. **D**, MMP8 wild-type and knockout VSMCs were transfected with ADAM10 siRNA or control siRNA and cultured on 6-well plates (50 000 cells/well) for 4 days, then harvested and counted; the column chart shows the means (±SEM) of cell counts in 4 independent experiments. **E**, Nearly confluent MMP8 wild-type and knockout VSMCs transfected with ADAM10 siRNA or control siRNA were cultured on 6-well plates and subjected to scratch wound healing assays; the column chart shows the means (±SEM) of migrated distance in 4 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01.

To investigate whether ADAM10 might be involved in MMP8 regulation of VSMC proliferation and migration, we treated VSMCs with GI254023X, an ADAM10 specific inhibitor that binds the S1' specificity pocket of ADAM10 and prevents ADAM10 from shedding surface molecules on cells.³² In these experiments, we found that GI254023X treatment did not alter ADAM10 protein level or propeptide cleavage (data not shown). The experiment showed that GI254023X significantly reduced proliferation and migration of MMP8 wild-type VSMCs but had no such effect on MMP8 knockout VSMCs (Figure 4A–4C). An additional experiment further demonstrated that knockdown of the endogenous ADAM10 with specific ADAM10 siRNA also reduced proliferation and migration of MMP8 wild-type VSMCs (Figure 4D–4E), supporting the notion

that ADAM10 plays a role in MMP8 regulation of VSMC proliferation and migration.

We then performed proliferation and migration in the absence or presence of recombinant mouse ADAM10. The experiments showed that the addition of the recombinant ADAM10 rescued the proliferative and migratory ability of MMP8 knockout VSMCs (Figure 5A and 5B), further supporting that ADAM10 plays a role in MMP8 regulation of VSMC proliferation and migration.

Effect of MMP8 on N-Cadherin, β-Catenin, Cyclin D1, and WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 1

ADAM10 can cleave and shed cell surface N-cadherin,^{17–21} an adhesion molecule that can exert an effect on VSMC

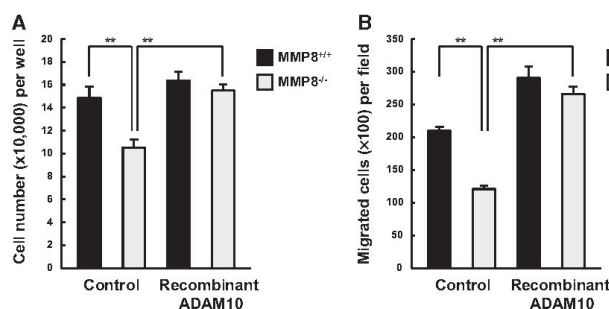


Figure 5. The proliferative and migratory ability of matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockout vascular smooth muscle cells (VSMCs) was rescued by recombinant a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10). VSMCs were isolated from aortas of MMP8^{-/-}/apoE^{-/-} and MMP8^{+/+}/apoE^{-/-} mice. **A**, Cells were cultured on 6-well plates (50 000 cells/well) in the absence or presence of recombinant mouse ADAM10 (20 ng/mL) for 4 days and harvested and counted; the column chart shows the means (±SEM) of cell counts in 3 independent experiments. **B**, Cells (50 000 cells/insert) were subjected to migration assays in the absence or presence of

recombinant mouse ADAM10 (20 ng/mL) and quantification of numbers of migrated cells; the column chart shows the means (±SEM) in 3 experiments. **P<0.01.

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at University of Calgary on July 10, 2014

proliferation via the cadherin- β -catenin complex.⁵⁻⁷ After the finding that MMP8 wild-type VSMCs had higher levels of mature ADAM10 than MMP8 knockout VSMCs, we investigated whether there were differences in the concentrations of N-cadherin and β -catenin between MMP8 wild-type and knockout VSMCs. We found that plasma membranes of MMP8 wild-type VSMCs contained less N-cadherin than plasma membranes of MMP8 knockout VSMCs (Figure 6A) and that incubation of VSMCs with the ADAM10 inhibitor GI254023X increased the amounts of N-cadherin on plasma membranes (Figure 6A). In contrast, MMP8 wild-type VSMC-conditioned media had higher concentrations of N-cadherin than MMP8 knockout VSMC-conditioned media (Figure 6B).

Knockdown of endogenous ADAM10 by siRNA resulted in a marked decrease in the amount of N-cadherin in conditioned media of MMP8 wild-type VSMCs (Figure 6B), whereas incubation of VSMCs with a recombinant ADAM10 led to a significant increase in N-cadherin concentration in conditioned media of MMP8 knockout VSMCs (Figure 6B).

It has been shown that N-cadherin shedding can result in dissociation of the cadherin- β -catenin complex and translocation of β -catenin into the nucleus where β -catenin interacts with a transcription factor complex to upregulate the expression of cell proliferation proteins such as cyclin D1 and

WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1).^{5,6,33}

In our study, we found that nuclei of MMP8 wild-type VSMCs had a higher concentration of β -catenin than nuclei of MMP8 knockout VSMCs (Figure 6C), and that its concentration was reduced if VSMCs were transfected with ADAM10 specific siRNA (Figure 6C). In addition, we found that compared with MMP8 knockout VSMCs, MMP8 wild-type VSMCs expressed the higher levels of the cell proliferation proteins cyclin D1 and WISP1 (Figure 6D and 6E), and that their levels were reduced when VSMCs were treated with GI254023X (Figure 6D) or transfected with ADAM10 specific siRNA (Figure II in the online-only Data Supplement). In contrast, their expression levels in MMP8 knockout VSMCs were significantly increased if cells were cultured in the presence of a recombinant ADAM10 (Figure 6E).

ADAM10 and β -Catenin in Vessel Injury-Induced Neointima Lesions

To study the relationship of MMP8 with ADAM10, N-cadherin, and β -catenin in neointima formation, we examined the cellular location and temporal expression of ADAM10, N-cadherin, and β -catenin in carotid arteries of apoE^{-/-}/MMP8^{+/+} and apoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice at various time points after vessel injury. The experiment showed that ADAM10 colocalized with VSMCs

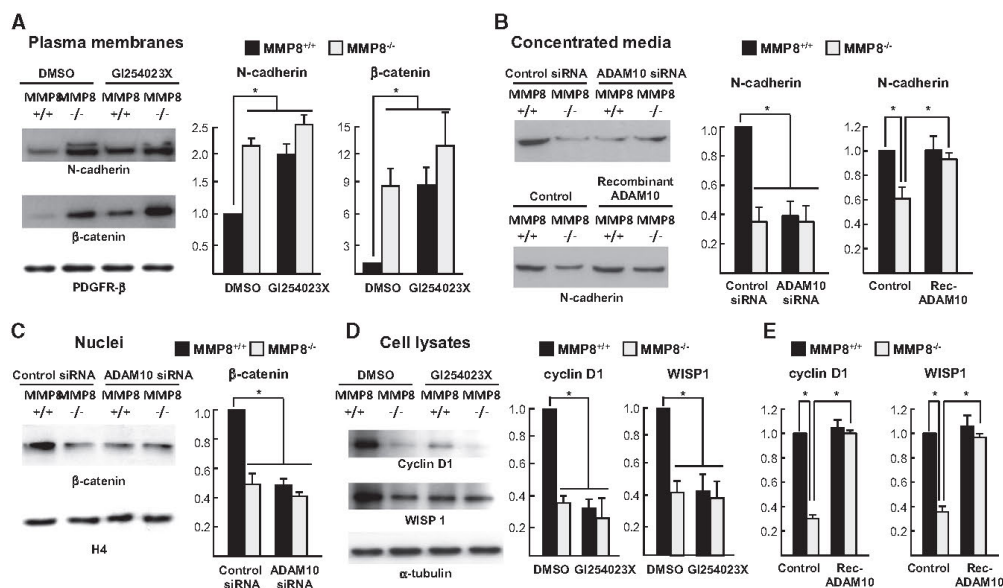


Figure 6. Matrix metalloproteinase-8 (MMP8) knockout and/or a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) inhibition reduces N-cadherin shedding and β -catenin signaling. MMP8 wild-type and knockout vascular smooth muscle cells (VSMCs) were cultured in the presence or absence of the ADAM10 specific inhibitor GI254023X (5 μ M/L) or ADAM10 siRNA or recombinant ADAM10 (Rec-ADAM10; 20 ng/mL). **A–D**, Protein preparations from plasma membranes, nuclei, cell lysates, or conditioned media were subjected to immunoblot analyses and band intensities quantified. Shown are representative images each from 3 independent experiments, and column charts of relative protein levels (mean \pm SEM; n=3). **A**, N-cadherin and β -catenin values were standardized against values of the membrane protein loading control platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β); **B**, equal amounts of protein were loaded in every lane; **C**, β -catenin values were standardized against values of the nuclear protein loading control histone 4 (H4); **D**, values of cyclin D1 and WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) were standardized against values of the cell lysate protein loading control α -tubulin. **E**, Total cellular RNA was subjected to real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Column charts show relative RNA levels (mean \pm SEM; n=3). * P <0.05.

and N-cadherin in the media and neointima, with noticeable accumulation in the arteries of apoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice subjected to injury (Figures III and IV in the online-only Data Supplement). Importantly, there was substantial nuclear accumulation of β -catenin in the neointima in apoE^{-/-}/MMP8^{-/-} mice (Figure V in the online-only Data Supplement), supporting a relationship of MMP8 with ADAM10 and β -catenin in vessel injury-induced neointima formation.

Discussion

VSMC migration and proliferation is a key process in neointima formation responsible for postangioplasty restenosis.¹⁻⁴ Our study shows that MMP8 promotes VSMC proliferation and migration. Using an established mouse model, we found that knockout of MMP8 significantly deterred neointima formation after vessel injury. Ex vivo experiments of VSMCs isolated from MMP8 knockout and wild-type mice, respectively, showed that MMP8 knockout resulted in VSMCs having decreased proliferative and migratory ability, indicating a positive effect of MMP8 on VSMC proliferation and migration. By proteomic analysis and follow-up experiments, we identified a molecular pathway mediating such effects of MMP8 on VSMCs. Specifically, we found that MMP8 knockout resulted in a reduction of the amount of mature ADAM10 versus the amount of pro-ADAM10, an increase of N-cadherin and β -catenin on the plasma membrane, a decrease in β -catenin translocation to the nucleus, and lower expression of the cell proliferation proteins cyclin D1 and WISP1. To our knowledge, this is the first report of a role of MMP8 in VSMC proliferation and migration and in neointima formation.

In this study, we found that MMP8 knockout VSMC-conditioned media had significantly less ADAM10 propeptide and ectodomains than MMP8 wild-type VSMC-conditioned media. ADAM10 contains several structural domains including a signal peptide, a propeptide domain, a metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain, a cysteine-rich domain, a transmembrane domain, and a cytoplasmic domain.²⁸ The metalloproteinase domain has proteolytic activity, whereas the propeptide domain blocks the proteolytic active site in the metalloproteinase domain and is removed during ADAM10 maturation.^{28,29} The results of our study indicate that MMP8 has an effect on ADAM10 maturation in VSMCs. Activated ADAM10 can mediate shedding of some transmembrane proteins including N-cadherin.¹⁷⁻²¹ Interestingly, ADAM10 itself is also subjected to shedding, which releases ADAM10 ectodomains from the plasma membrane,^{30,31} and the shedded ADAM10 ectodomains can function as a soluble protease with increased mobility.^{30,31} There is evidence indicating that ADAM10 ectodomain shedding in different tissues/cells requires different proteases; however, their identities are still unknown for most tissues/cells, apart from neuronal cells where ADAM10 can be shedded by ADAM9 and ADAM15.³⁰ The results of our study implicate MMP8 in ADAM10 shedding in VSMCs.

We found that plasma membranes of MMP8 wild-type VSMCs contained substantially less N-cadherin than plasma membranes of MMP8 knockout VSMCs, whereas MMP8 wild-type VSMC-conditioned media had higher concentrations of N-cadherin than MMP8 knockout VSMC-conditioned

media, and that incubation of VSMCs with the ADAM10 inhibitor GI254023X increased the amounts of N-cadherin on plasma membranes whereas knockdown of ADAM10 in VSMCs reduced the amount of N-cadherin in conditioned media of MMP8 wild-type VSMCs. These findings suggest that the effect of MMP8 on N-cadherin shedding is mediated, at least in part, by ADAM10. Interestingly, a previous study showed that MMP9 and MMP12, but not MMP2 or MMP14, can cause N-cadherin shedding on VSMCs.³⁴ Thus, it seems that MMP9 and MMP12 can shed N-cadherin, whereas MMP8 can promote N-cadherin shedding by ADAM10.

An important role of N-cadherin in modulating VSMC proliferation via the β -catenin signaling pathway has been elegantly demonstrated by other investigators.^{5,6} On the plasma membrane, N-cadherin interacts with β -catenin, forming cadherin- β -catenin complexes. Cleavage of N-cadherin results in dissociation of these 2 proteins, allowing β -catenin to be translocated into the nucleus, where β -catenin interacts with the transcription factor T cell-specific transcription factor^{5,6,35-37} and thereby regulates the transcription of several genes that encode proteins involved in cell proliferation, such as cyclin D1 and WISP1.^{5,6,17-27,33,35-37} In this study, we found that MMP8 wild-type VSMCs contained substantially less β -catenin in the plasma membrane than MMP8 knockout VSMCs, whereas nuclei of MMP8 wild-type VSMCs had more β -catenin than nuclei of MMP8 knockout VSMCs. In agreement, the expression levels of the cell proliferation proteins cyclin D1 and WISP1 were higher in MMP8 wild-type VSMCs. We also found that inhibition of ADAM10 activity by GI254023X substantially increased the amount of β -catenin in the plasma membrane and that knockdown of ADAM10 by siRNA markedly reduced the amount of β -catenin in the nucleus of MMP8 wild-type VSMCs and the expression levels of cyclin D1 and WISP1 in these cells. These findings are consistent with an effect of MMP8 on β -catenin signaling, mediated by ADAM10. It is noteworthy that such an effect has also been observed in stem/progenitor cells as we reported recently.⁹

Some other members of the MMP family have also been reported to have important roles in VSMC proliferation. It has been shown that VSMCs isolated from MMP9 knockout mice have a significantly lower proliferation rate than VSMCs from wild-type mice,³⁸ and that MMP9 and MMP12 promote VSMC proliferation by shedding N-cadherin and activating the β -catenin signaling pathway.³⁴ Meanwhile, MMP2 and MMP14 have been shown to play a role in oxidized low density lipoprotein-induced VSMC proliferation involving a sphingomyelin/ceramide signaling pathway.³⁹ The difference in VSMC proliferation between MMP8 wild-type and knockout is not attributable to a change in the expression of those MMPs because we showed in our previous study that there is no difference in their expression between MMP8 wild-type and knockout.¹³

Migration of VSMCs from the arterial media to the intima is also an important process in the development of vascular lesions, especially neointima formation underlying restenosis or in stent-restenosis after angioplasty or stent implantation. Our study showed that MMP8 wild-type VSMCs had greater migratory ability than MMP8 knockout VSMCs, and

that this difference was abolished by the ADAM10 inhibitor GI254023X or ADAM10 knockdown by siRNA, whereas the reduced migratory ability of MMP8 knockout VSMCs could be rescued by incubating cells with a recombinant ADAM10. These findings suggest that MMP8 has an effect on VSMC migration via its effect on ADAM10. This is consistent with the findings of other studies showing that ADAM10 can disrupt cell-cell adhesion attributable to its effect on cadherins and thereby facilitate cell migration.^{17,22,26}

In addition to ADAM10, several other proteins also showed significantly different concentrations between MMP8 knockout and wild-type VSMC-conditioned media in the proteomic analysis, including ADAMTS-like protein 2, cell growth regulator with EF hand domain protein 1, collagen α -2(V) chain, retinoid-inducible serine carboxypeptidase, and SCO-spondin. However, the biological functions of these proteins are largely unknown.

In summary, our study demonstrates that MMP8 plays an important role in neointima formation after vessel injury. Although it is likely that the overall contribution of MMP8 to its pathogenesis would involve multiple cell types and mechanisms, the results of our study indicate that MMP8 modules VSMC proliferation and migration and that this is at least partly via its effect on ADAM10 and consequently on N-cadherin and the β -catenin signaling pathway.

Sources of Funding

We thank the British Heart Foundation for support (PG/08/051/25141, PG/11/40/28891, PG/13/45/30326, and FS/11/28/28758). Q. Xiao is the recipient of a British Heart Foundation Intermediate Basic Science Research Fellowship (FS/09/044/28007). F. Zhang was the recipient of a scholarship from the Chinese Scholarship Council. The work forms part of the research themes contributing to the translational research portfolio of Barts Cardiovascular Biomedical Research Unit, which is supported and funded by the National Institute of Health Research. Work performed in the University of Naples was supported by the Italian Government Grant PRIN2007 (2007LTAJMA_001).

Disclosures

None.

References

- Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-1339.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
- Liu MW, Roubin GS, King SB 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989;79:1374-1387.
- Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:1667-1687.
- Ugnow EB, Slater S, Sala-Newby GB, Aguilera-Garcia CM, Angelini GD, Newby AC, George SJ. Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*. 2003;92:1314-1321.
- Quasnicka H, Slater SC, Beeching CA, Boehm M, Sala-Newby GB, George SJ. Regulation of smooth muscle cell proliferation by beta-catenin/T-cell factor signaling involves modulation of cyclin D1 and p21 expression. *Circ Res*. 2006;99:1329-1337.
- Sabatini PJ, Zhang M, Silverman-Gavrila R, Bendick MP, Langille BL. Homotypic and endothelial cell adhesions via N-cadherin determine polarity and regulate migration of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2008;103:405-412.
- Bedel A, Nègre-Salvayre A, Heeneman S, Grazide MH, Thiers JC, Salvayre R, Maupas-Schwalm F. E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res*. 2008;103:694-701.
- Xiao Q, Zhang F, Lin L, et al. Functional role of matrix metalloproteinase-8 in stem/progenitor cell migration and their recruitment into atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2013;112:35-47.
- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation*. 2001;104:1899-1904.
- Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, Alvarez-Sabin J, Cairols M, Badimon L. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis*. 2006;187:161-169.
- Tuomainen AM, Nyyssönen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen TP, Salonen JT, Sorsa T, Pussinen PJ. Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2722-2728.
- Laxton RC, Hu Y, Duchene J, et al. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res*. 2009;105:921-929.
- Lindner V, Fingertle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res*. 1993;73:792-796.
- Grassia G, Maddaluno M, Musilli C, De Stefano D, Carnuccio R, Di Lauro MV, Parratt CA, Kennedy S, Di Meglio P, Ianaro A, Maffia P, Parenti A, Ialenti A. The I(kappa)B kinase inhibitor nuclear factor-(kappa)B essential modulator-binding domain peptide for inhibition of injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2458-2466.
- Grassia G, Maddaluno M, Guglielmotti A, Mangano G, Biondi G, Maffia P, Ialenti A. The anti-inflammatory agent bindarit inhibits neointima formation in both rats and hyperlipidaemic mice. *Cardiovasc Res*. 2009;84:485-493.
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J*. 2005;24:742-752.
- Reiss K, Maretzky T, Haas IG, Schulte M, Ludwig A, Frank M, Saftig P. Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-proteoglycan C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem*. 2006;281:21735-21744.
- Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, Nimomiya H, Sugimoto H, Kinoshita A, Shimohama S. Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci Lett*. 2006;402:278-283.
- Shoval I, Ludwig A, Kalchauer C. Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development*. 2007;134:491-501.
- Kohutek ZA, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci*. 2009;29:4605-4615.
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9182-9187.
- Wild-Bode C, Fellerer K, Kugler J, Haass C, Capell A. A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. *J Biol Chem*. 2006;281:23824-23829.
- Maretzky T, Scholz F, Köten B, Proksch E, Saftig P, Reiss K. ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1737-1746.
- Dittmer A, Hohlfield K, Lützkendorf J, Müller LP, Dittmer J. Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66:3053-3065.
- Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, Reiss K. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*. 2008;102:1192-1201.
- Donners MM, Wolfs IM, Olieslagers S, Mohammadi-Motahhari Z, Tchaikovski V, Heeneman S, van Buul JD, Caolo V, Molin DG, Post MJ, Waltenberger J. A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> at University of Calgary on July 10, 2014

- angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2188–2195.
28. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 2008;29:258–289.
 29. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*. 2003;17:7–30.
 30. Tousseyn T, Thathiah A, Jorissen E, Raemaekers T, Konietzko U, Reiss K, Maes E, Snellinx A, Serneels L, Nyabi O, Annaert W, Saftig P, Hartmann D, De Strooper B. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem*. 2009;284:11738–11747.
 31. Cissé MA, Sunyach C, Lefranc-Jullien S, Postina R, Vincent B, Checler F. The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem*. 2005;280:40624–40631.
 32. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005;8:161–171.
 33. Marchand A, Atassi F, Gaaya A, Leprince P, Le Feuvre C, Soubrier F, Lompré AM, Nadaud S. The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans. *Aging Cell*. 2011;10:220–232.
 34. Dwivedi A, Slater SC, George SJ. MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby beta-catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:178–186.
 35. Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a002915.
 36. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006;281:22429–22433.
 37. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127:469–480.
 38. Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res*. 2002;91:845–851.
 39. Augé N, Maupas-Schwalm F, Elbaz M, Thiers JC, Waysbort A, Itohara S, Krell HW, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2004;110:571–578.

Significance

Smooth muscle cells are the main constituents of neointima lesions responsible for restenosis after angioplasty. The pathogenesis of neointima formation involves smooth muscle cell proliferation and their migration from the arterial media into the intima. In this study, we found that matrix metalloproteinase-8 plays an important role in vascular smooth muscle cell migration and proliferation, via activating the protease a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10, which in turn breaks down the cell adhesion molecular N-cadherin and also releases the protein β -catenin, allowing the latter to translocate to the cell nucleus to activate the expression of proteins required for cell proliferation. These findings are useful for understanding the molecular pathways involved in vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and suggest that matrix metalloproteinase-8 could be a potential target for development of therapeutics for preventing postangioplasty restenosis.

3.1.1. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Durch die im Arbeitskreis von Prof. Schmidt verbesserte Synthese von GI254023X **91** war es möglich, den selektiven Inhibitor in sehr guter Qualität herzustellen und einige neue regulatorische Mechanismen, Funktionen und Substrate von ADAM10 zu identifizieren.

So konnte ein Zusammenhang von Huntingtin mit ADAM10 in der neuronalen Zelladhäsion offenbart werden. Htt reguliert die ADAM10-Aktivität durch Inhibition der selbigen, wodurch auch die N-Cadherinspaltung und folglich die Zelladhäsion beeinflusst wird.²⁸⁹

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass durch die Proteolyse von CD23 ein lösliches sCD23-Fragment abspalten wird, welches zu einer Freisetzung von Immunglobulin E führt. Hierdurch konnte eine Verbindung von ADAM10 zu allergischen Reaktionen verdeutlicht werden.²⁹⁰

Untersuchungen an Stamm-/Vorläuferzellen haben aufgedeckt, dass die Metalloprotease MMP-8 ADAM10 aus pro-ADAM10 freisetzt und somit aktiviert. Die indirekt oder direkt durch MMP-8 ausgelöste Spaltung von E-Cadherin beeinflusst die Migrationsfähigkeit von SPCs zu atherosklerosen Läsionen.²⁹¹

Zusätzliche Experimente zur Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen konnten offenbaren, dass MMP-8 diese durch einen ADAM10-, N-Cadherin-, β -Catenin-vermittelten Mechanismus erhöht. Folglich hat ADAM10 auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von Neointima.²⁹²

Ausblick

Im Hinblick auf ADAM10-beeinflusste physiologische und pathologische Vorgänge sind noch viele Fragen offen. So sind bereits weitere Untersuchungen unter Verwendung des ADAM10-Inhibitors GI254023X **91** geplant. Dabei soll z. B. der Effekt der ADAM10-Inhibition auf die Embryonalentwicklung weiter untersucht werden. Hierzu kann der Zebrafisch als Modell herangezogen werden. Zusätzlich soll der Einfluss von ADAM10 und dessen Inhibition auf das Renal-Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) evaluiert werden.

In Anbetracht der zahlreichen Substrate und Funktionen, von denen stetig immer neue offenbart werden, erscheint die Aktivierung der α -Sekretase/ADAM10 als Behandlungsstrategie von AD nicht mehr aussichtsreich. Die Wirkstoffforschung für die klinische Anwendung sollte auf andere vielversprechendere Targets fokussiert werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten drei Teilprojekte bearbeitet werden. Die Synthesen der γ -Sekretase-Modulatoren, der DYRK1A-Inhibitoren und des ADAM10-Inhibitors gelang durch die Anwendung etablierter Synthesestrategien oder Variation dieser. Eine ausführliche Zusammenfassung und ein Ausblick ist jeweils in den Unterkapiteln der Beschreibung der Ergebnisse und Diskussion (Kapitel 3) enthalten.

γ -Sekretase-Modulatoren

Anhand der synthetisierten GSMs auf Basis des Carbazolgrundgerüsts konnten Informationen über Struktur-Aktivität-Beziehungen erhalten werden.

Da viele NSAID-abgeleitete GSMs eine Carbonsäurefunktion aufweisen, die aber für die klinische Applikation nachteilig ist, wurde der Einfluss dieser Funktion anhand von Säureisosteren untersucht. Das dargestellte Amidcarbazolderivat **95** inhibiert die γ -Sekretase moderat, zeigt aber keine modulierende Aktivität. Insgesamt wurde offenbart, dass die Carbonsäurefunktion oder eine metabolisch labile Esterfunktion für die Aktivität als potenter GSM notwendig sind.²⁵¹

Die Variation der Carbonsäureposition am Carprofen Grundgerüst in dem Derivat **98** führte zu keiner Steigerung der Aktivität.

Zusätzlich wurden Neutronenbeugungsuntersuchungen zur Lokalisation von GSM, die in partiell deuterierter und protonierter Form synthetisiert wurden, durchgeführt. Hierbei diente die partielle Deuterierung als Markierung. Dabei offenbarten alle durchgeführten Messungen, dass die verwendeten Labels auf Höhe der Lipidkopfgruppen oder in der Nähe dieser angesiedelt sind. Hiervon ausgehend erscheint die Hypothese, dass der lipophile Rest als „Membrananker“ fungiert, fraglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten eher auf eine gedrehte Orientierung hin.

Insgesamt sollte die Entwicklung neuer GSMs nicht fortgesetzt werden, solange keine weiteren Informationen über die Proteinstruktur und den Mechanismus der Modulation bekannt sind. Zumal bereits potentere GSMs auf anderen Grundgerüsten entwickelt werden konnten. Weitere Untersuchungen zur Orientierung der GSMs in der Membran sind denkbar und würden voraussichtlich weitere wesentliche Erkenntnisse für die Wirkstoffentwicklung liefern.

DYRK1A

Es ist gelungen, ein computerbasiertes Modell zu erstellen, dass die Vorhersage der Bindungsmodi und Aktivitäten neuer DYRK1A-Inhibitoren, die auf der Leitstruktur des β -Carbolins basieren. Hierfür wurden ein Liganden-basiertes Pharmakophormodell und ein Struktur-basiertes Protein/Liganden-Docking kombiniert. Das Modell konnte anhand von sieben synthetisierten Derivaten, die eine gute Aktivität gegenüber DYRK1A aufweisen, bestätigt werden. Durch Evaluation der biologischen Aktivität der Derivate konnten die Grenzen des Modells aufgezeigt werden und Struktur-Aktivität-Beziehungen ermittelt werden. Der größte Nachteil des zurzeit potentesten und oral bioverfügbaren DYRK1A-Inhibitors Harmin **25**, besteht in der Koinhibition von MAO-A, die zu nicht tolerierbaren Nebeneffekten führt. Darum wurden die neuen DYRK1A-Inhibitoren auch in Hinblick auf eine verbesserte Selektivität untersucht. Das synthetisierte *N*-Heptylharmin **157** inhibiert DYRK1A potenter und beeinflusst MAO-A deutlich geringer als Harmin **25**. Es stellt damit einen vielversprechenden neuen selektiven DYRK1A-Inhibitor dar. In diesem Bereich sind zahlreiche Fortsetzungen der Forschung denkbar. So sollten weitere Derivate mit Substituenten an der favorisierten N-H-Position dargestellt werden, die einerseits die Löslichkeit verbessern und andererseits die Selektivität weiter erhöhen. Zusätzlich sollte die Selektivität des besten Derivats **157** weiter untersucht werden, so ist die Evaluation der Aktivität gegenüber nahe verwandten Kinasen notwendig.

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, wurden einige Tau-Liganden auf Basis der Carbolinleitstruktur publiziert.¹⁴⁹ Begründet durch diese Voruntersuchungen sollten die neuen β -Carbolinderivate auf ihre Affinität gegenüber Tau geprüft werden.

Neben der Weiterentwicklung der DYRK1-Inhibitoren sollte das Konzept der Erstellung eines computerbasierten Modells für weitere Targets appliziert werden, wodurch der Synthesaufwand deutlich verringert werden könnte. Hierdurch könnten gleichzeitig die Kosten gesenkt und die Umwelt geschont werden. Die ausführlichere Zusammenfassung der durchgeführten Untersuchungen der DYRK1A-Inhibitoren und ein Ausblick zu diesem Thema sind in Kapitel 3.2.5 zu finden.

ADAM10 und GI254023X **91**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der einzige selektive ADAM10-Inhibitor GI254023X **91** in sehr guter Qualität dargestellt, um die Untersuchung neuer regulatorische Mechanismen, Funktionen und Substrate von ADAM10 zu ermöglichen. In Zusammenarbeit mit Sardo *et al.* konnte ein Zusammenhang von Huntingtin mit ADAM10 in der neuronalen Zelladhäsion offenbart werden. Hierfür wurde die Neurulation an htt-mangelnden Stammzellen und

htt-knockdown Zebrafischlarven erforscht, wobei eine neue Funktion des htt-Proteins offenbart wurde. Htt reguliert die ADAM10-Aktivität durch Inhibition der selbigen, wodurch auch die N-Cadherinspaltung und folglich die Zelladhäsion beeinflusst wird.²⁸⁹

Eine separate Studie in Kooperation mit Cooper *et al.* konnte eine Verbindung von ADAM10 zu allergischen Reaktionen verdeutlichen. Dies wurde anhand der Proteolyse von CD23 durch ADAM10 gezeigt, wobei ein lösliches sCD23-Fragment abspalten wird. Anschließend induziert freies sCD23 die Freisetzung von Immunglobulin E.²⁹⁰

Zusätzlich haben Untersuchungen an Stamm-/Vorläuferzellen aufgedeckt, dass die Metalloprotease MMP-8 pro-ADAM10 aktiviert, was zur Freisetzung von ADAM10 führt. Die indirekt oder direkt durch MMP-8 ausgelöste Spaltung von E-Cadherin beeinflusst die Migrationsfähigkeit von SPCs zu atherosklerosen Läsionen.²⁹¹ Experimente zur Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen konnten beweisen, dass MMP-8 diese durch einen ADAM10-, N-Cadherin-, β -Catenin-vermittelten Mechanismus erhöht. Somit hat ADAM10 auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von Neointima.²⁹²

Da der ADAM10-Inhibitor, GI254023X **91**, bereits in vier Untersuchungen erfolgreich für die Evaluation neuer Funktionen und Substrate eingesetzt wurde und noch zahlreiche weitere physiologische und pathologische Vorgänge von ADAM10 beeinflusst werden könnten, sollten weitere Studien unter Zuhilfenahme des Inhibitors **91** unternommen werden.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeine Anmerkungen

5.1.1. Allgemeine Anmerkungen zu den chemisch-synthetischen Arbeiten

Lösungsmittel und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien, deren Herstellung nicht angegeben ist, stammen von den Firmen ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Fischer Scientific, Sigma Aldrich und VWR. Diese Substanzen wurden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Die absoluten Lösungsmittel wurden von Acros Organics in mit Septum versiegelten Flaschen erworben. Bei wässrigen Lösungen handelt es sich um gesättigte Lösungen, sofern nicht anders angegeben.

Reaktionen

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Die hierfür benutzten Glasgeräte wurden ausgeheizt und die Spritzen bei 60 °C gelagert und vor Verwendung mit Argon gespült.

Mikrowelle

Reaktionen in der Mikrowelle wurden in mit Teflon-beschichteten Kappen verschlossenen Glasgefäßen durchgeführt. Bei dem Mikrowellengerät handelt es sich um das Modell Initiator (300 W) der Firma Biotage.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien vom Typ 60 F₂₅₄ der Firma Merck verwendet. Die Indikation erfolgte durch Fluoreszenzdetektion (UV-Licht, $\lambda = 254 \text{ nm}$) und mit Hilfe unterschiedlicher Färbereagenzien (Kaliumpermanganat-, Vanillin- oder Ninhydrin-Tauchreagenz) mit anschließender Wärmebehandlung.²⁹³

Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 der Firma Merck mit der Korngröße 15-40 μm unter leichtem Überdruck durchgeführt. Das entsprechende Eluentenverhältnis der Laufmittelgemische ist in den Versuchsvorschriften angegeben. Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Automatisierte Flash-Chromatographie

Eine Automatisierte Reinigung erfolgte an dem Gerät Teledyne ISCO Combi Flash RF 4X. Informationen zu dem Säulenmaterial, der Säulengröße und dem verwendeten Lösungsmittel sind in den entsprechenden Versuchsdurchführungen angegeben.

HPLC

Die HPLC-Messungen wurden an dem Gerät Agilent 1100 (Säule: *reversed phase*, Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 150 mm; Wellenlängendetektion: 254 nm) durchgeführt. Als Laufmittel wurden Mischungen aus Wasser (1 % Trifluoressigsäure) und Acetonitril verwendet. Der Gradientenverlauf der verwendeten Methode entsprach 30 % bis 90 % Acetonitril in 12 min.

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Spektren wurden an den Geräten AC 300 (300 MHz), AC 500 (500 MHz) und DRX 500 (500 MHz) der Firma Bruker Biospin GmbH bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte an den Geräten AC 300 (75 MHz), AC 500 (125/126 MHz) und DRX 500 (125/126 MHz) der Firma Bruker Biospin GmbH. Das verwendete Lösungsmittel ist jeweils angegeben und die Kalibrierung erfolgte auf das vom Restprotonengehalt oder ^{13}C -Anteil verursachte Signal.²⁹⁴ Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in der Einheit ppm und die der Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Die Multiplizitäten der Protonensignale werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Pentett, m = Multipllett. Vor der Multiplizitätsangabe können ggf. die Abkürzungen stehen: d = doppelt, b = breites Signal. Die in ^{13}C -Spektren angegebenen Multiplizitäten entsprechen denen nicht entkoppelter Spektren: s = Singulett (entspricht quartärem Kohlenstoff), d = Dublett (tertiärer Kohlenstoff), t = Triplett (sekundärer Kohlenstoff), q = Quartett (primärer Kohlenstoff). Sofern nötig, wurden für eine vollständige Interpretation ^1H - ^1H -Korrelationsspektren (COSY) und ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren (HMBC, HSQC) aufgenommen.

Massenspektrometrie

Die Ermittlung der Massen erfolgte mit einem Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer (ESI-MS-Spektren) und mit einem MAT 95 doppelt fokussierenden Massenspektrometer (EI-MS-Spektren). Die detektierten Ionenmassen m/z werden in u angegeben.

Nach Literaturvorschrift synthetisierte Substanzen

2-(6-Chlor-9H-carbazol-7-yl)propansäurebenzylester **123**,⁷⁹ 2-(2-Methoxyethoxy)ethyltosylat **115b/162a**, 2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyltosylat **162b**,^{278, 279} 6-Chlorharmin (BSc5049) **158**, 8-Chlorharmin (BSc5048) **159**,²⁸¹ N-(2-Iodphenyl)-2, 4-dimethyloxazol-5-amin **175**, Vorläufer von 1,3-Dimethyl-9H-pyrido[3,4-b]indol **176**,²⁸² 1-Iod-4-methoxy-2-nitrobenzol **177**,²⁸³ 2-Iod-5-methoxyanilin **169**²⁸⁴ und GI254023X **91**²³⁵ wurde nach publizierter Synthesevorschrift dargestellt.

5.1.2. Allgemeine Anmerkungen zu den biologischen Arbeiten

Das γ -Sekretase-Assay^{81, 82, 251, 252}

Die Bestimmung der γ -Sekretase modulierenden Aktivität wurde vom Kooperationspartner Hoffmann-La Roche durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein publiziertes Assay an H4 APP $\Delta 9$ Zellen.^{81, 82, 251, 252} Diese APP-überexprimierende Zelllinie wird aus stabilen, transfizierten menschlichen Neuroglioma-H4-Zellen erhalten. Die Proben wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll (Meso Scale Discovery) präpariert. Dafür werden die Substanzen in DMSO vorgelöst und mit einem Zellkulturmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Für eine Quantifizierung der gebildeten A β -Peptide wurde eine *liquid phase electrochemiluminescence* (LPECL) basierte Untersuchung an einem Meso Scale Discovery Gerät durchgeführt. Für die Messung der Elektrochemilumineszenz werden drei für die C-terminale Sequenz der A β -Peptide mit 38, 40 und 42 Aminosäuren spezifische Antikörper verwendet. Hierbei handelt es sich um die Antikörper BAP15, BAP19 und BAP24, die jeweils den Elektrochemolumineszenz-aktiven TAG-Ester enthalten. Zusätzlich wird der mit Biotin versehene Antikörper 6E10-bio eingesetzt, der an die N-terminale Sequenz der A β -Fragmente bindet. Die IC₅₀- und EC₅₀-Werte werden unter Verwendung der GraphPad Prism Software berechnet.

Die Bestimmung der Überlebensrate erfolgte mit Hilfe eines kolorimetrischen Zellproliferation-Assays (CellTiter 96TM AQ assay, Promega), in dem die Bio reduktion vom Owen's Reagenz (MTS) zu Formazan gemessen wird. Nach Zugabe der MTS/PES-Lösung zu den vorbereiteten Proben wird nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Die Zelltoxizität wird als %-Anteil der gemessenen Probe zu einer unbehandelten Probe angegeben.

Assay zur Bestimmung der DYRK1A-Inhibition²⁹⁵

Die Bestimmung der Aktivität der Substanzen gegenüber DYRK1A wurde von der Firma Cerep durchgeführt. Bei dem verwendeten Assay handelt es sich um eine von Himpel *et al.* publizierte Prozedur.²⁹⁵ Das eingesetzte Enzym ist eine humane Rekombinante von DYRK1A. Die Substrate ATP und Ulight-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-Amid (100 nM) werden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inhibition von DYRK1A wurde aus der Messung der Phosphorylierung des Substrats zum Produkt phospho-Ulight-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-Amid bei Anwesenheit eines potentiellen Inhibitors, im Vergleich zu dem Umsatz bei einer Negativkontrolle (Wasser, DMSO) ermittelt. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin **30** ($IC_{50}(\text{DYRK1A}) = 25 \text{ nM}$) eingesetzt. Bei der Detektions-Methode handelt es sich um ein Verfahren von Lance. Jede Messung wurde als Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse sind angegeben als %-Inhibition zur Kontroll- spezifischen-Aktivität = $100 - [(\text{gemessene Aktivität der Substanz} / \text{Aktivität der Kontrolle}) * 100]$ bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ der Testsubstanz.

Assay zur Bestimmung der MAO-A-Inhibition²⁹⁶

Die Bestimmung der Aktivität der Substanzen gegenüber MAO-A wurde von der Firma Cerep durchgeführt. Bei dem verwendeten Assay handelt es sich um eine von Weyler *et al.* publizierte Prozedur.²⁹⁶ Als Quelle von MAO-A dient die humane Plazenta. Die Aktivität des Enzyms wird spektrophotometrisch bestimmt, indem der Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 314 nm gemessen wird. Dieses basiert auf der Oxidation des Substrats Kynurenin (0.15 mM) zu 4-Hydroxyquinolin.²⁹⁷ Die Inkubation erfolgte 30 min bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Als Referenzsubstanz für die Positivkontrolle wurde Clorgylin **178** ($IC_{50}(\text{MAO-A}) = 37 \text{ nM}$) eingesetzt.²⁸⁸ Jede Messung wurde als Duplikat durchgeführt. Die Ergebnisse sind angegeben als %-Inhibition zur Kontroll- spezifischen-Aktivität = $100 - [(\text{gemessene Aktivität der Substanz} / \text{Aktivität der Kontrolle}) * 100]$ bei Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ der Testsubstanz.

5.1.3. Allgemeine Anmerkungen zur Neutronendiffraktion

Die Neutronenbeugungs-Messungen wurden in Kooperation mit Dr. T. Hauß und Prof. Dr. N. A. Dencher am Helmholtz-Zentrum in Berlin durchgeführt. Als Gerät wurde ein V1 Membran-Diffraktometer mit Neutronen einer Wellenlänge von 0.457 nm benutzt. Die lamellaren Membranproben (10 mg) wurden zusammen mit der zu untersuchenden

Substanzprobe, aufgebracht auf dünne Quartz-Platten, in einer Aluminium-Luftfeuchtigkeitkammer (98 % rel. Humidität - erhalten aus gesättigter Kaliumsulfat-Lösung) für 24 h zur Gleichgewichts-einstellung inkubiert. Die benutzte Modellmembran besteht aus drei Bestandteilen; 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin **145** (POPC), Sphingomyelin **146** (SM) und Cholesterin **147**, welche im Verhältnis 1 : 1 : 0.67 mol% eingesetzt wurden. Die drei Komponenten wurden von Avanti Polar Lipids, Inc. erhalten und ohne Aufreinigung verwendet.

Die Datensätze wurden bei 15 °C und 37 °C aufgenommen, um den Einfluss der Temperatur auf die Position der Derivate in der Membran zu untersuchen.

Die Diffraktionsintensitäten wurden mittels Rocking Scans aufgenommen, dabei handelt es sich um eine Methode in welcher der Detektor nahe eines vorher kalkulierten Streuwinkels 2θ eines Bragg-Peaks platziert wird. Die gebeugten Intensitäten wurden ermittelt, indem eine Gaußsche Normalverteilung mit einem linearen Untergrund über jeden Diffraktions-Peak gelegt wurde und die integrierte Fläche der Gaußglocke bestimmt wurde. Strukturfaktoren $f(h)$ wurden nach folgender Formel aus der gestreuten Intensität $I(h)$ berechnet:

$$f(h) = \sqrt{I(h)A(h)h}$$

In der Formel ist h die Ordnung der Diffraktion, $A(h)$ ist der Absorptionskorrekturfaktor und die Lorentz-Korrektur ist proportional zu h . Daten aus unterschiedlichen Proben wurde skaliert über die Summe der Strukturfaktoren mit Messungen bei 8 % deuteriertem Wasser (D_2O), wobei die Streulängendichte (*scattering length density*, SLD) der Wasserschicht gleich null ist.

Die SLD hat eine willkürliche Einheit $\rho(z)$ und wurde aus den Strukturfaktoren über eine Fourier-Summierung kalkuliert:

$$\rho(z) = \rho_0 - \frac{2}{dk} \sum_{h=1}^n f(h) \left(\cos \frac{2\pi h z}{d} \right)$$

Dabei ist z die Entfernung von der Mitte der Lipid-Doppelschicht, ρ_0 ist das Produkt der durchschnittlichen SLD der Zelleinheit und der mittleren Fläche eines Lipids, d ist die Wiederholungseinheit der Membranpackung und k ist ein vom Instrument-abhängiger Skalierungsfaktor.

5.1.4. Allgemeine Anmerkungen zu den Docking-Methoden

Die Docking-Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit C. Scholz mit der Software *Molecular Operating Environment* (MOE) durchgeführt.²⁷⁴

Die Liganden wurden mit dem *Builder* Werkzeug von MOE entworfen. Und wie folgt bearbeitet: (1) Wasserstoffatome wurden zugefügt und die Ladungen wurden unter Verwendung des *Potential Setup*-Interface bestimmt, (2) eine Energieminimierung mit dem *MMFF94X*-Kraftfeld und einer Abstands-abhängigen Dielektrizitätskonstante für die Lösungsmittel-Betrachtung bis zu einem Gradienten von 0,01 kcal/mol wurde durchgeführt.²⁷⁴

Die röntgenkristallographische Struktur des Harmin **25**/DYRK1A-Komplexes (PDB: 1ANR) und des Harmin **25**/MAO-A-Komplexes (PDB: 2Z5X) wurde mit der *LigX*-Programmoberfläche kalkuliert. *LigX* führt einige Strukturpräparationsschritte automatisch zusammen durch, dazu gehören: Entfernen von nicht gebundenen Wassermolekülen, Protonierungen über die Funktion *protonate 3D*, Zuordnung von ASN/GLN/HIS-„Flips“, geometrische Optimierungen und Energieminimierung des Rezeptors ($\text{RMSD}_{\text{Gradient}} = 0.1 \text{ kcal/mol}$).^{274, 298} Das *Generalized Born/Volume Integral Electrostatics*-Modell wurde für ferne Wechselwirkungen und Lösungsmittelleffekte benutzt.²⁹⁹ Das *AMBER12:EHT*-Kraftfeld wurde zur Energieminimierung eingesetzt und ist sowohl für Proteine als auch für kleinere Moleküle geeignet.^{300, 301}

Der Ablauf des Dockings kann in folgende Schritte untergliedert werden: (1) Generierung der Konformationen der Liganden, (2) Positionierung in die aktive Tasche, (3) Bewertung, (4) Verfeinerung der Pose und (5) erneute Bewertung. Bei Erstellung der Konformationen wird auf eine Sammlung bevorzugter Drehwinkel von rotierbarer Bindungen zurückgegriffen, wobei bis zu 5000 Konformationen berechnet werden. Sollten für ein Molekül eine höhere Anzahl an Konformationen möglich sein, wird die Auswahl stochastisch eingeschränkt. Die Positionierung des Liganden erfolgte pharmakophorbasiert. Dabei wurde im Falle des Harmin **25**/DYRK1A-Komplexes ein aromatisches System und ein Stickstoffatom vorgegeben. Für den Harmin **25**/MAO-A-Komplex wurde noch ein weiteres aromatisches System als Einschränkung eingeführt. Die generierten Posen wurden durch die *Scoring*-Funktion London dG bewertet. Die *Scoring*-Funktion London dG besteht aus fünf Energieanteilen: Änderungen der Rotations- und Translationsentropie (c), Energieänderung durch Verlust von Flexibilität (E_{Flex}), Energiebeiträge basierend auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken ($E_{\text{H-Bond}}$), Beiträge aus Metallkomplexierungen ($E_{\text{M-Lig}}$) und Energieänderungen aus der Desolvatisierung von Atomen (D_{atom}). Die 30 bestbewerteten Posen wurden anhand einer

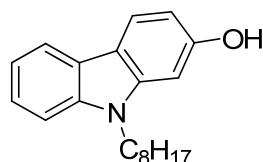
Energieminimierung innerhalb der aktiven Tasche erneut verfeinert. Hierfür wurde das *AMBER12:EHT*-Kraftfeld ($\text{RMSD}_{\text{Gradient}} = 0.1 \text{ kcal/mol}$) benutzt.

Die daraus erhaltenen Posen wurden erneut mit der London *dG-Scoring*-Funktion bewertet und die zehn besten Ergebnisse wurden aufgelistet. Die der natürlichen Liganden-Orientierung ähnlichste Pose wurde mit Hilfe der Wissen-basierten DSX^{CSD} -Funktion ermittelt. Diese *knowledge-based Scoring*-Funktion basiert auf der Summe aus statistischen Potentialen, die aus einer Datenbank (CSD-Datenbank) mit bekannten Protein-Liganden-Komplexen errechnet werden. Dadurch werden die natürlichen Bindungsgeometrien sehr gut wiedergegeben.²⁷⁶

5.2. Beschreibung der Synthesen aus Kapitel 3.1

5.2.1. Synthese von BSc4531²⁵¹

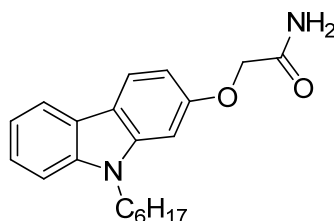
2-Hydroxy-*N*-octylcarbazol **96** (BSc4029)²⁵¹



NaH (55 % Dispersion, 120 mg, 2.74 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (2 mL) suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. 2-Hydroxycarbazol **97** (250 mg, 1.37 mmol) wird zu der Suspension gegeben. Nach 30 min Voraktivierung wird Octylbromid (226.4 μ L, 1.30 mmol) zugetropft, die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird langsam Wasser zugetropft. Die Mischung wird dreimal mit DCM extrahiert und die vereinten organischen Phasen werden mit Brine gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : DCM = 1:1) lieferte das BSc4029 **96** (265 mg, 69 %) als farblosen Feststoff. Das Produkt **96** wurde ohne weitere Strukturbestimmung in der folgenden Stufe eingesetzt.

HPLC: t_R = 9.20 min (93 %).

2-((9-Octyl-9*H*-carbazol-2-yl)oxy)acetamid **95** (BSc4531)²⁵¹



Eine Suspension aus 2-Hydroxy-*N*-octylcarbazol **96** (BSc4029) (80 mg, 0.27 mmol) und K₂CO₃ (75 mg, 0.54 mmol) in abs. DMF (3 mL) wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde 2-Bromoacetamid (56 mg, 0.41 mmol) zugegeben und die Mischung 60 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung

(Cyclohexan : Ethylacetat = 10:1 → 1:1) lieferte BSc4531 **95** (83 mg, 87 %) als farblosen Feststoff.

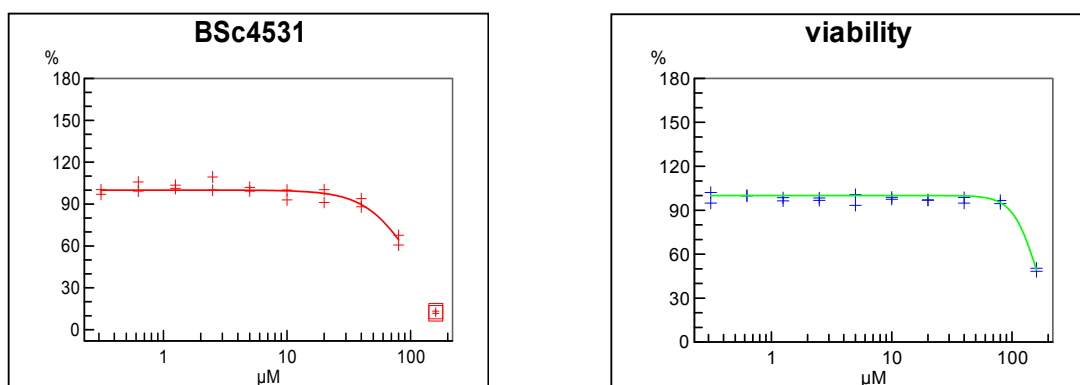
HPLC: $t_R = 8.69$ min (99 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 500 MHz): $\delta = 8.02\text{-}7.98$ (m, 2H), 4.43-7.36 (m, 2H), 7.23-7.20 (m, 1H), 6.88-6.85 (m, 2H), 6.65 (bs, 1H), 5.73 (bs, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.85 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.41-1.21 (m, 10H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 126 MHz): $\delta = 171.3, 156.5, 141.7, 140.9, 125.0, 122.8, 121.5, 119.9, 119.3, 118.1, 108.8, 107.4, 94.4, 68.0, 43.3, 31.9, 29.9, 29.5, 29.3, 29.0, 27.5, 22.8, 14.2$ ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 352 $[\text{M}]^+$.

5.2.2. Biologische Evaluation von BSc4531²⁵¹



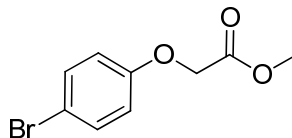
$\text{IC}_{50}(\text{A}\beta_{42}) = 104 \mu\text{M}$

Zelltoxizität bei 160 μM vorhanden

Anmerkung: Die Graphiken und Daten der biologischen Evaluation sind bereits von Zall *et al.* veröffentlicht worden. Es handelt sich um eine Kopie aus Zall *et al.* 2011 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. Copyright © 2011, Elsevier.²⁵¹

5.2.3. Synthese von BSc4530

2-(4-Bromphenol)essigsäuremethylester **102**



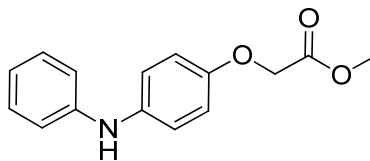
4-Bromphenol **103** (2 g, 11.56 mmol) und Kaliumcarbonat (4.79 g, 34.68 mmol) wurden in Aceton (50 mL) suspendiert und auf 60 °C erhitzt. 2-Bromessigsäuremethylester (2.12 g, 13.87 mmol) wurden zugetropft und die Suspension wurde bei 60 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Wasser zugefügt und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt **102** (2.83 g, 100 %) wurde in quantitativer Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten und ohne weitere Aufarbeitung in der folgenden Stufe eingesetzt.

HPLC: t_R = 6.18 min (91 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 300 MHz): δ = 7.41-7.36 (m, 2H), 6.82-6.77 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.80 (s, 3H) ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 245 (244 + 246)[M]⁺.

Methyl-2-(4-(phenylamino)phenoxy)acetat **100**



2-(4-Bromphenol)essigsäuremethylester **102** (600 mg, 2.47 mmol) wurde in einen ausgeheizten Kolben eingewogen und 1 h im Hochvakuum getrocknet, bis keine Bläschenbildung mehr beobachtet wurde. Unter Argonatmosphäre wurden Anilin **101** (276 mg, 2.96 mmol), Caesiumcarbonat (965 mg, 2.96 mmol), BINAP (92 mg, 0.15 mmol) und Pd(OAc)₂ (33 mg, 0.15 mmol) zugegeben und erneut 30 min im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde Toluol (25 mL) zugegeben und 36 h bei 110 °C gerührt. Wasser wurde zugegeben und die abgetrennte wässrige Phase wurde viermal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : DCM = 4:1 → 0:1) lieferte das Diphenylamin **100** (358 mg, 56 %) als braunen amorphen Feststoff.

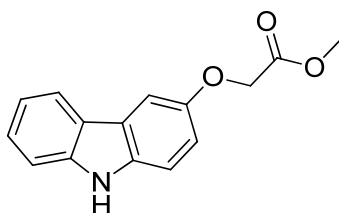
HPLC: $t_R = 7.12$ min (97 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 500 MHz): $\delta = 7.23$ (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.93 – 6.84 (m, 3H), 4.62 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 126 MHz): $\delta = 169.7, 153.7, 144.1, 136.7, 129.5, 121.8, 120.9, 116.9, 115.9, 66.1, 52.4$ ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 257[M] $^+$.

Methyl-2-(9*H*-carbazol-2-yloxy)acetat **99**



Das Diphenylamin **100** (400 mg, 1.56 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (349 mg, 1.56 mmol) und $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (424 mg, 2.33 mmol) wurden in einem verschließbaren Mikrowellengefäß in Essigsäure (12 mL) und Toluol (2 mL) suspendiert. Die Mischung wurde mit Sauerstoffgas gespült und bei 111 °C, 3 h lang in der Mikrowelle bestrahlt. Anschließend wurde Wasser zugegeben und viermal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : DCM = 1:1 \rightarrow 1:3) lieferte das Carbazol **99** (202 mg, 51 %) als braunen Feststoff.

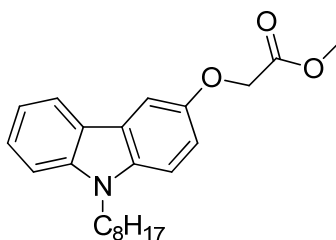
HPLC: $t_R = 6.55$ min (94 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 300 MHz): $\delta = 8.01$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.97 (bs, 1H), 7.56 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 2H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 7.12 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.84 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 126 MHz): $\delta = 170.1, 152.3, 140.5, 135.2, 126.2, 124.0, 123.4, 120.5, 119.4, 115.8, 111.5, 110.9, 105.3, 67.0, 52.4$ ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 255[M] $^+$.

Methyl-2-(9-octyl-9*H*-carbazol-2-yloxy)acetat (BSc4529) 104



Das Carbazolderivat **99** (50 mg, 0.20 mmol) und Caesiumcarbonat (128 mg, 0.39 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in abs. DMF (2 mL) suspendiert. Nach 30 min Voraktivierung wurde Octylbromid (57 mg, 0.29 mmol) zugetropft und die Suspension über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : DCM = 1:1 → 1:3) lieferte das *N*-Octylcarbazol **104** (BSc4529) (48 mg, 67 %) als farblosen Feststoff.

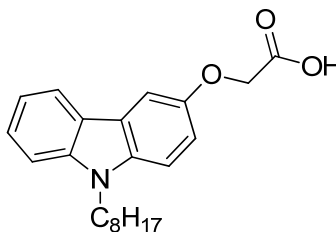
HPLC: t_R = 9.96 min (98 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 8.03 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.45 (ddd, J = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.21-7.15 (m, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.26 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.85 (dt, J = 14.9, 7.4 Hz, 2H), 1.41 – 1.20 (m, 10H), 0.86 (t, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): δ = 170.1, 151.9, 141.2, 136.6, 125.9, 123.2, 122.6, 120.5, 118.5, 115.5, 109.6, 108.9, 105.4, 67.1, 52.4, 43.4, 31.9, 29.9, 29.5, 29.3, 29.9, 27.5, 22.7, 14.2 ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 367[M]⁺.

2-(9-Octyl-9*H*-carbazol-2-yloxy)essigsäure (BSc4530) 98



Der Ester **104** (40 mg, 0.11 mmol) wurde in Methanol (5 mL) und 2M Natronlauge (0.44 mL, 0.87 mmol) gelöst und über Nacht gerührt. Das Produkt wurde durch Zugabe von 1M Salzsäure ausgefällt. Nach vollständiger Kristallisation wurde der Niederschlag abfiltriert und dreimal mit leicht saurem Wasser (wenige Tropfen Salzsäure) gewaschen. Anschließend

wurde der Feststoff einmal mit wenig destilliertem Wasser gespült und im Hochvakuum getrocknet. BSc4530 **98** (36 mg, 93 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

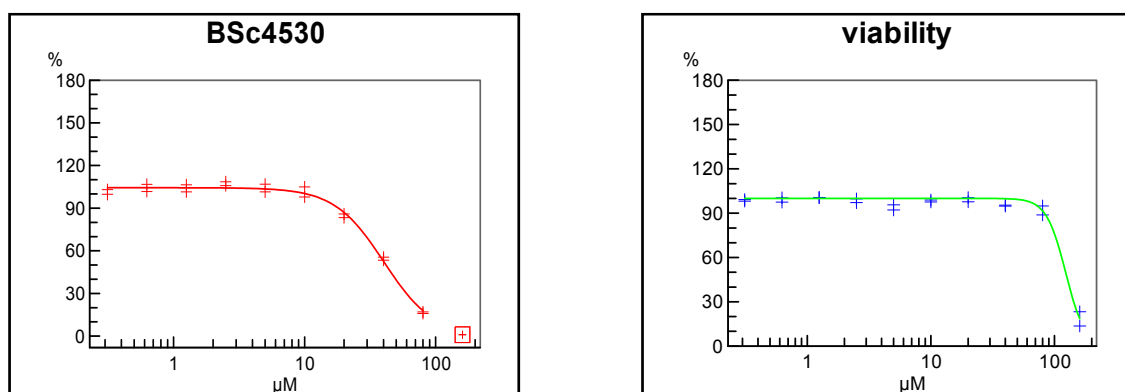
HPLC: $t_R = 8.82$ min (99 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 500 MHz): $\delta = 8.04$ (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H), 7.56 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.47-7.37 (m, 1H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.22-7.16 (m, 2H), 4.80 (s, 2H), 4.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.85 (dt, $J = 14.9, 7.4$ Hz, 2H), 1.42 - 1.23 (m, 10H), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 126 MHz): $\delta = 172.2, 151.0, 141.0, 136.3, 125.8, 123.1, 122.3, 120.3, 118.4, 115.1, 109.4, 108.8, 105.4, 66.5, 43.1, 31.7, 29.6, 29.3, 29.1, 28.9, 27.2, 22.6, 14.0$ ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 353[M] $^+$.

5.2.4. Biologische Evaluation von BSc4530

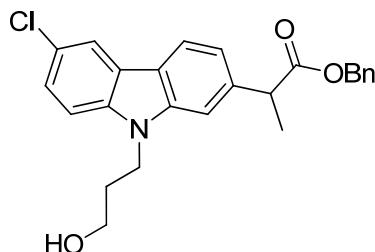


$$\text{IC}_{50}(\text{A}\beta_{42}) = 40.3 \mu\text{M}$$

Zelltoxizität bei 160 μM vorhanden

5.2.5. Synthese der PEG- und PPG-Carprofenderivate aus Kapitel 3.1.3

2-(6-Chlor-9-(3-propanol)-9*H*-carbazol-2-yl)propansäurebenzylester **124**



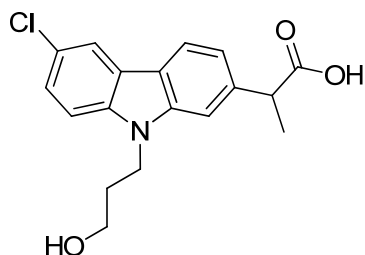
2-(6-Chlor-9*H*-carbazol-7-yl)propansäurebenzylester **123** (400 mg, 1.10 mmol)⁷⁹ wurde mit Caesiumcarbonat (718 mg, 2.20 mmol) unter Argonatmosphäre in abs. DMF suspendiert. Nach 30 min Voraktivierung wurde 3-Brom-1-propanol (230 mg, 1.65 mmol) zugegeben. Nach 12 h enthielt die Reaktionsmischung noch die Hälfte des Edukts und weiteres 3-Brom-1-propanol (230 mg, 1.65 mmol) wurde zugetropft. Die Mischung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : Ethylacetat = 10:1 → 2:1) lieferte das Produkt **124** (160 mg, 34 %) als farblosen Feststoff.

HPLC: t_R = 8.75 min (81 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 8.01 (dd, J = 1.8, 0.5 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.39 – 7.37 (m, 2H), 7.28 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 7.23 (dd, J = 6.8, 2.9 Hz, 2H), 7.18 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 5.15 – 5.06 (m, 2H), 4.48 – 4.35 (m, 2H), 3.97 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.56 – 3.45 (m, 2H), 2.06 – 2.00 (m, 2H), 1.64 (d, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126MHz): δ = 174.8, 141.5, 139.3, 136.1, 128.6, 128.3, 128.1, 125.8, 124.6, 123.9, 121.2, 120.7, 120.1, 119.3, 109.8, 108.0, 66.7, 59.3, 46.3, 39.3, 31.4, 19.1 ppm.

2-(6-Chlor-9-(3-propanol)-9H-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4849) 125



Der Ester **124** (71 mg, 0.17 mmol) wurde in Methanol (3 mL) gelöst und mit 2M Natronlauge (0.84 mL, 1.68 mmol) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Methanol wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 2M HCl angesäuert. Die trübe Suspension wurde zur vollständigen Kristallisation über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die überstehende Lösung wurde abgetrennt und der Niederschlag mit Wasser gespült. Nach Trocknen im Vakuum wurde BSc4849 **125** (43 mg, 77 %) als farbloser Niederschlag erhalten.

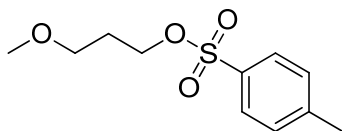
HPLC: $t_R = 6.26$ min (95 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , DMSO- $d_5 = 2.50$ ppm, 500 MHz): $\delta = 8.20$ (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J = 8.1, 1.1$ Hz, 1H), 4.65 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.85 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.45 – 3.37 (m, 2H), 1.90 (p, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.46 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , DMSO- $d_6 = 39.52$ ppm, 126MHz): $\delta = 175.5, 140.7, 140.1, 138.8, 125.2, 123.2, 123.1, 120.8, 120.0, 119.7, 118.7, 110.7, 108.3, 58.0, 45.3, 31.7, 18.9$ ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 331[M] $^+$.

3-Methoxypropyltosylat 127



Natriumhydroxid (55 mg, 1.36 mmol) wurde in Wasser (0.5 mL) gelöst. THF (1 mL) und 3-Methoxypropanol **118** (95 mg, 1.05 mmol) wurden zu der Lösung zugefügt. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid **116** (200 mg, 1.05 mmol) wurde zugeben. Nach 12 h bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit 2M Salzsäure und Brine extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum

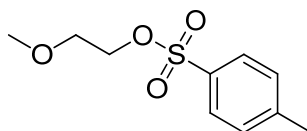
eingengt. Das als farbloses Öl erhaltene Tosylat **127** (205 mg, 80 %) wurde ohne weitere Reinigung in der folgenden Synthesestufe eingesetzt.

HPLC: $t_R = 6.10$ min (89 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 300 MHz): $\delta = 7.82 - 7.76$ (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 2H), 4.13 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 1.95 – 1.84 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 75 MHz): $\delta = 143.8, 132.3, 128.9, 127.1, 67.2, 66.9, 57.8, 28.5, 20.8$ ppm.

2-Methoxyethyltosylat **115a**



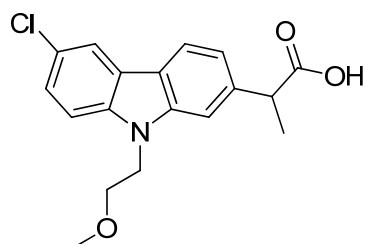
Natriumhydroxid (1.4 g, 33.75 mmol) wurde in Wasser (0.5 mL) gelöst. THF (4 mL) und 3-Methoxyethanol (2.0 g, 26.32 mmol) wurden zu der Lösung zugefügt. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid **116** (5.5 g, 28.96 mmol) wurde zugeben. Nach 12 h bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit 2M Salzsäure und Brine extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Die leicht trübe Lösung wurde über Kieselgel filtriert (Laufmittel: Ethylacetat). Das Tosylat **115a** (3.5 mg, 59 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

HPLC: $t_R = 5.58$ min (97 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 300 MHz): $\delta = 7.80$ (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.15 (dd, $J = 5.4, 4.0$ Hz, 2H), 3.57 (dd, $J = 5.3, 4.1$ Hz, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.44 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 75 MHz): $\delta = 144.9, 133.2, 129.9, 128.1, 70.1, 69.2, 59.1, 21.8$ ppm.

2-(6-Chlor-9-(2-methoxyethyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4850) 108



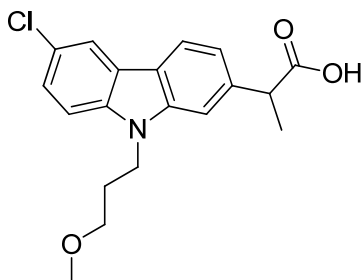
Unter Argonatmosphäre wurde Natriumhydrid (55 % Dispersion, 40 mg, 0.92 mmol) in abs. THF (0.5 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Carprofen **20** (50 mg, 0.18 mmol) wurde portionsweise zugegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde 2-Methoxyethyltosylat **115a** (84 mg, 0.37 mmol) zugegeben und die Suspension wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vollständiger Reaktion über Nacht wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit 2M Salzsäure angesäuert und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM : Methanol = 50:1) wurde zusätzlich noch aus DCM/Cyclohexan umkristallisiert. Das Carprofenderivat BSc4850 **108** (52 mg, 86 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

HPLC: t_R = 7.17 min (100 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 7.99 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.39-7.33 (m, 3H), 7.20 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 4.42 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.94 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.74 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.27 (s, 3H), 1.62 (d, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126MHz): δ = 180.1, 141.5, 139.6, 138.6, 126.0, 124.9, 124.0, 121.7, 120.9, 120.2, 119.4, 110.2, 108.3, 71.1, 59.4, 46.1, 43.6, 18.8 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 331[M]⁺.

2-(6-Chlor-9-(3-methoxypropyl)-9*H*-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4851) 110

Unter Argonatmosphäre wurde Natriumhydrid (55 % Dispersion, 159 mg, 3.66 mmol) in abs. THF (3 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Carprofen **20** (200 mg, 0.73 mmol) wurde portionsweise zugegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde 3-Methoxypropyltosylat **127** (268 mg, 1.10 mmol) zugegeben und die Suspension wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vollständiger Reaktion über Nacht wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit 2M Salzsäure angesäuert und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM : Methanol = 50:1) wurde das Carprofenderivat BSc4851 **110** (189 mg, 75 %) als farbloser Feststoff erhalten.

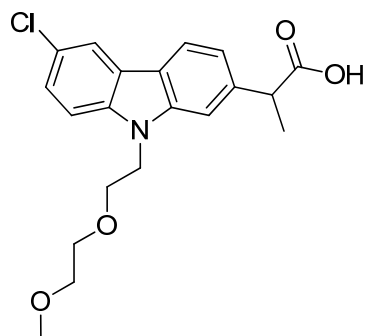
HPLC: t_R = 7.40 min (97 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 8.00 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.40-7.33 (m, 3H), 7.20 (dd, J = 8.5, 1.3 Hz, 1H), 4.38 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.94 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.22 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.08 (p, J = 6.0 Hz, 2H), 1.62 (d, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126MHz): δ = 180.1, 141.5, 139.5, 138.6, 126.0, 124.7, 123.9, 121.5, 120.9, 120.0, 119.2, 110.0, 108.2, 69.1, 58.8, 46.1, 39.8, 29.3, 18.8 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 345[M]⁺.

2-(6-Chlor-9-(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4852) 109



Unter Argonatmosphäre wurde Natriumhydrid (55 % Dispersion, 40 mg, 0.92 mmol) in abs. THF (0.5 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Carprofen **20** (50 mg, 0.18 mmol) wurde portionsweise zugegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde 2-(2-Methoxyethoxy)-ethyltosylat **115b/162a**^{278, 279} (100 mg, 0.37 mmol) zugegeben und die Suspension wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vollständiger Reaktion über Nacht wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit 2M Salzsäure angesäuert und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM : Methanol = 50:1) wurde das Carprofenderivat BSc4852 **109** (62 mg, 90 %) als farbloser Feststoff erhalten.

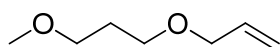
HPLC: t_R = 6.95 min (99 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 7.96-7.94 (m, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.36 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.20 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 4.38 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.93 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.80 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.49-3.47 (m 2H), 3.42-3.40 (m 2H), 3.30 (s, 3H), 1.62 (d, J = 7.5 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126MHz): δ = 179.1, 141.5, 139.4, 138.6, 125.8, 124.8, 123.9, 121.5, 120.7, 120.0, 119.3, 110.0, 108.4, 72.0, 70.8, 69.6, 59.1, 46.0, 43.4, 29.8, 18.7 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 375[M]⁺.

3-(3-Methoxypropoxy)propen 131a



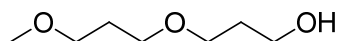
Natriumhydrid (55 % Dispersion, 3.4 g, 78.23 mmol) wurde in THF (60 mL) suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. 3-Methoxypropanol **118** (4.7 g, 52.15 mmol) wurde unter starker

Gasentwicklung langsam zugegeben. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur 10 min gerührt, bevor Tetrabutylammoniumiodid (3.9 g, 10.43 mmol) zugegeben wurde. Nach weiteren 10 min wurde unter Eiskühlung Allylbromid **132** (8.2 g, 67.80 mmol) zugetropft. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgebrochen und die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander einmal mit 1M Salzsäure, zweimal mit destilliertem Wasser und einmal mit Brine extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das zurückgebliebene Öl wurde im Vakuum (100 mbar, 55-57 °C) destilliert. Der Ether **131a** (5.4 g, 80 %) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 500 MHz): $\delta = 5.91$ (ddt, $J = 17.2, 10.4, 5.6$ Hz, 1H), 5.21 (ddq, $J = 26.0, 10.4, 1.5$ Hz, 1H), 5.16 (ddd, $J = 10.4, 3.1, 1.3$ Hz, 1H), 3.96 (dt, $J = 5.6, 1.4$ Hz, 2H), 3.49 (dt, $J = 12.8, 6.4$ Hz, 4H), 3.33 (s, 3H), 1.85 (p, $J = 6.4$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm, 126MHz): $\delta = 135.1, 116.9, 72.0, 69.9, 67.4, 58.8, 30.2$ ppm.

3-(3-Methoxypropoxy)propanol **130a**

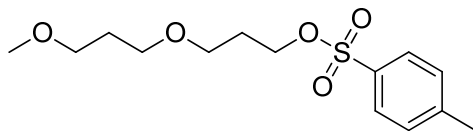


Allylether **131a** (200 mg, 1.54 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (3 mL) gelöst und mit Boran 1M in THF (1.54 mL, 1.54 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 4N Natronlauge (1.5 mL) und Wasserstoffperoxid (35 % ige wässrige Lösung, 1 mL) zugegeben und erneut für 3 h gerührt. Ethylacetat wurde zugegeben und die wässrige Phase wurde mit Natriumchlorid gesättigt. Die Mischung wurde 20 min gerührt. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Alkohol **130a** (227 mg, 100 %) wurde in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm, 500 MHz): $\delta = 3.78$ (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.63 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.53 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 1.88 – 1.81 (m, 4H) ppm

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126MHz): δ = 70.5, 70.0, 68.5, 62.4, 58.8, 32.0, 31.9, 29.9 ppm.

3-(3-Methoxypropoxy)propyltosylat **129a**

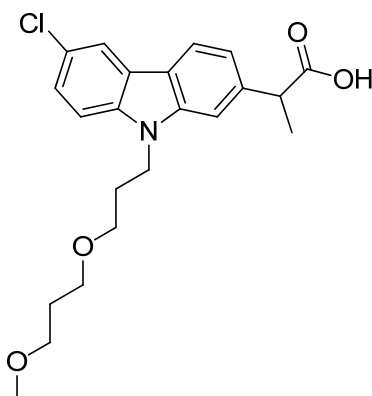


Natriumhydroxid (16 mg, 0.40 mmol) und 3-(3-Methoxypropoxy)propanol **130a** (30 mg, 0.20 mmol) wurde in Wasser (5 µL) und THF (100 µL) gelöst. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (58 mg, 0.30 mmol) wurde zugeben. Nach 12 h bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit 2M Salzsäure und Brine extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Achtung: Das Rohprodukt darf nicht erwärmt werden. Die leicht trübe Lösung wurde über Kieselgel filtriert (Laufmittel: Ethylacetat). Das Tosylat **129a** (28 mg, 46 %) wurde als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

HPLC: t_R = 6.44 min (72 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 300 MHz): δ = 7.83 – 7.76 (m, 2H), 7.37 – 7.32 (m, 2H), 4.13 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.80 – 3.75 (m, 2H), 3.65 – 3.59 (m, 2H), 3.55 – 3.35 (m, 4H), 3.33 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 1.94 – 1.70 (m, 4H) ppm. (Anmerkung: NMR zeigt Verunreinigungen z. B. Edukt)

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 75 MHz): δ = 144.8, 131.3, 130.0, 128.1, 70.6, 70.0, 68.5, 67.9, 58.8, 32.1, 29.9, 21.8 ppm. (Anmerkung: NMR zeigt Verunreinigungen z. B. Edukt)

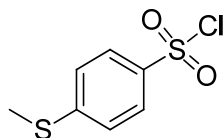
2-(6-Chlor-9-((3-methoxypropoxy)propyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäure (BSc5050) 111

Unter Argonatmosphäre wurde Natriumhydrid (55 % Dispersion, 10 mg, 0.23 mmol) in abs. THF (0.4 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Carprofen **20** (13 mg, 0.05 mmol) wurde portionsweise zugegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde 3-(3-Methoxypropoxy)-propyltosylat **129a** (28 mg, 0.09 mmol) zugegeben und die Suspension wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach vollständiger Reaktion über Nacht wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit 2M Salzsäure angesäuert und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM : Methanol = 50:1) wurde das Carprofenderivat BSc5050 **111** (15 mg, 81 %) als farbloser Feststoff erhalten.

HPLC: t_R = 7.51, 7.63 min (96 %).

5.2.6. Synthese der Carprofenderivate aus Kapitel 3.1.4

4-(Thioanisol)sulfonsäurechlorid **140a**



Thioanisol **142a** (0.50 g, 4.03 mmol) wurde in Chloroform (5 mL) gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Nach Erreichen der Temperatur wurde Chlorsulfonsäure (1.41 g, 12.08 mmol) langsam zugetropft und 1.5 h gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt und mit Eiswasser (50 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Umkristallisation aus Cyclohexan lieferte das Sulfonsäurechlorid **140a** (0.23 g, 26 %) als farbloses Öl.

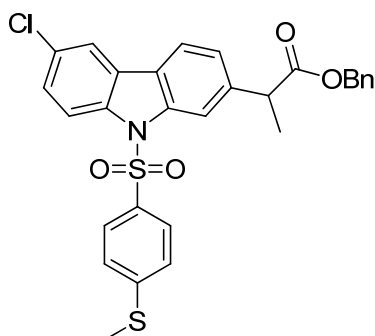
HPLC: t_R = 7.86 min (67 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 300 MHz): δ = 7.93-7.87 (m, 2H), 7.38-7.33 (m, 2H), 2.55 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 75MHz): δ = 150.2, 139.9, 127.3, 125.4, 14.8 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 222[M]⁺.

2-(6-Chlor-9-(4-(thioanisol)sulfonyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäurebenzylester **144a**



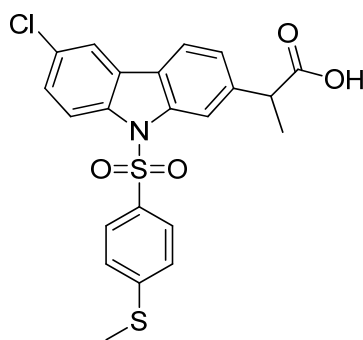
Natriumhydrid (55 % Dispersion, 18 mg, 0.41 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (10 mL) suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. 2-(6-Chlor-9H-carbazol-7-yl)propansäurebenzylester **123** (100 mg, 0.28 mmol)⁷⁹ wurde in abs. THF (1 mL) gelöst und zu der Suspension gegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde 4-(Thioanisol)sulfonsäurechlorid **140a** (92 mg, 0.41 mmol) langsam zugegeben. Die

Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 h gerührt. Nach Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : Ethylacetat = 10:1) lieferte das Produkt **144a** (110 mg, 73 %), welches direkt in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

HPLC: t_R = 10.54 min (83 %).

MS (m/z, 70 eV, EI) = 549 [M]⁺.

2-(6-Chlor-9-(4-(thioanisol)sulfonyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4130) 138



2-(6-Chlor-9-(4-(thioanisol)sulfonyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäurebenzylester 144a

(200 mg, 0.36 mmol) und Natriumhydroxid (22 mg, 0.55 mmol) wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Wasser/THF = 1:1:1.5 (4 mL) suspendiert und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und mit 2N HCl angesäuert. Der Niederschlag wurde filtriert und in Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Reinigung durch automatisierte Flash-Chromatographie (RediSep Säule: 12 g Silica, Gradient DCM : Methanol = 0 % → 25 % Methanol in 24 min, Flussrate 30 mL/min, t_R = 6.8 – 11.2 min) lieferte BSc4130 **138** (98 mg, 59 %) als farblosen Feststoff.

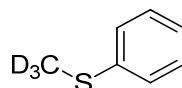
HPLC: t_R = 8.46 min (98 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 300 MHz): δ = 8.32 – 8.21 (m, 2H), 7.80 (dd, J = 9.5, 5.1 Hz, 2H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.43 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.33 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.05 – 6.98 (m, 2H), 3.97 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.66 (d, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 75MHz): δ = 179.5, 148.1, 140.3, 139.2, 137.2, 132.9, 130.1, 127.8, 127.6, 126.9, 125.2, 124.8, 124.0, 120.5, 120.1, 116.5, 115.0, 45.9, 18.6, 14.5 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 459[M]⁺.

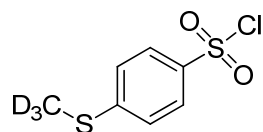
(Methylthio-d₃)benzol 142b³⁰²



Natriumcarbonat (3.66 g, 34.49 mmol) wurde in Ethanol (100 mL) suspendiert und Thiophenol **141** (3.45 g, 31.36 mmol) wurde zugegeben. Die Suspension wurde unter Argonatmosphäre für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Methyljodid-d₃ (5 g, 34.49 mmol) wurde langsam zugetropft und die Mischung wurde 6 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit Wasser und Brine extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Das erhaltene Öl wurde über eine kurze Kieselgelsäule filtriert, die mit DCM eluiert wurde. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte den Thioether **142b** (3.99 g, 31.36 mmol) in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl. Die Strukturbestimmung entsprach den veröffentlichten Daten.³⁰²

HPLC: t_R = 6.55 min (95 %).

(4-(Methylthio-d₃)phenyl)sulfonsäurechlorid **140b**



(Methylthio-d₃)benzol **142b** (1.99 g, 15.68 mmol) wurde in Chloroform (20 mL) gelöst und die Mischung wurde auf 0 °C abgekühlt. Nach Erreichen der Temperatur wurde Chlorsulfonsäure (5.48 g, 47.04 mmol) langsam zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Eiswasser (50 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Umkristallisation aus Cyclohexan lieferte das Sulfonsäurechlorid **140b** (1.87 g, 53 %) als farblosen Feststoff.

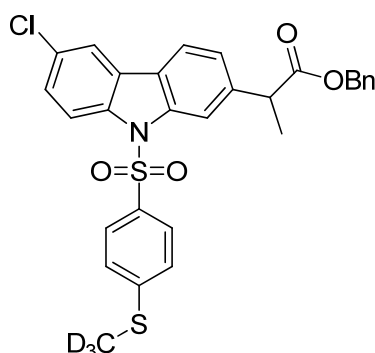
HPLC: $t_R = 7.68$ min (79 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): $\delta = 7.90$ -7.87 (m, 2H), 7.37-7.34 (m, 2H).

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): $\delta = 150.2$, 139.9, 127.3, 125.4, 14.1 (t, $J = 21.6$ Hz) ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 225[M]⁺.

2-(6-Chlor-9-(4-((methylthio-d₃)phenyl)sulfonyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäurebenzylester **144b**



Natriumhydrid (55 % Dispersion, 89 mg, 2.04 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (30 mL) suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. 2-(6-Chlor-9H-carbazol-7-yl)propansäurebenzylester **123** (494 mg, 1.36 mmol)⁷⁹ wurde in abs. THF (5 mL) gelöst und zu der Suspension gegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde (4-(Methylthio-d₃)phenyl)sulfonsäurechlorid **140b** (460 mg, 2.04 mmol) langsam zugegeben. Die

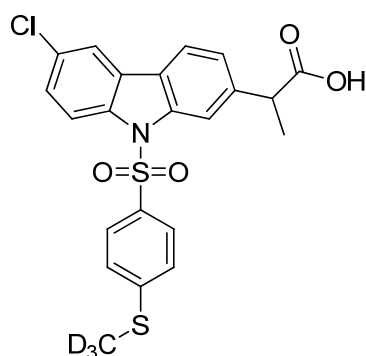
Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 h gerührt. Nach Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : Ethylacetat = 15:1 → 5:1) lieferte das Produkt **144b** (646 mg, 86 %) als farbloser Feststoff.

HPLC: t_R = 10.49 min (92 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 300 MHz): δ = 8.28 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 – 7.55 (m, 2H), 7.40 (dd, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.33 – 7.20 (m, 6H), 7.00 – 6.93 (m, 2H), 5.14 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 3.97 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 1.63 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

MS (m/z , 70 eV, EI) = 552 [M]⁺.

2-(6-Chlor-9-(4-((methylthio-d₃)phenyl)sulfonyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäure
(BSc4343) **139**



2-(6-Chlor-9-(4-((methylthio-d₃)phenyl)sulfonyl)-9H-carbazol-2-yl)propansäurebenzylester **144b** (620 mg, 1.12 mmol) und Natriumhydroxid (67 mg, 1.68 mmol) wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Wasser/THF = 1:1:1.5 (12 mL) suspendiert und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und mit 2N HCl angesäuert. Der Niederschlag wurde filtriert und in Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Reinigung durch automatisierte Flash-Chromatographie (RediSep Säule: 12 g Silica, Gradient DCM : Methanol = 0 % → 40 % Methanol in 24 min, Flussrate 30 mL/min, t_R = 0.6 – 2.8 min) lieferte BSc4343 **139** (223 mg, 43 %) als farblosen Feststoff.

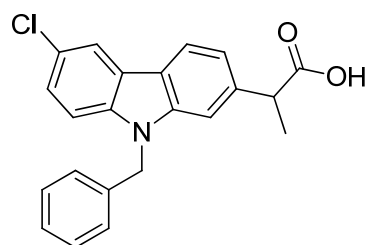
HPLC: t_R = 8.46 min (94 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 8.30 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.26 – 8.23 (m, 1H), 7.82 – 7.81 (m, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.63 – 7.59 (m, 2H), 7.43 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.02 – 6.98 (m, 2H), 3.97 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.66 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): δ = 180.3, 148.1, 140.2, 139.2, 137.2, 132.8, 130.1, 127.8, 127.6, 126.9, 125.2, 125.0, 124.0, 120.5, 120.0, 116.5, 115.0, 45.9, 18.6, 14.3 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 462[M]⁺.

2-(9-Benzyl-6-chlor-9*H*-carbazol-2-yl)propansäure **136** (BSc4077)³⁰³



Natriumhydrid (55 % Dispersion, 80 mg, 1.83 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (5 mL) suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Carprofen **20** (100 mg, 0.37 mmol) wurde zugegeben und nach 30 min wurde Benzylbromid zugetropft (94 mg, 0.55 mmol). Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde die Mischung mit 2N HCl angesäuert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan : Ethylacetat = 2:1) lieferte BSc4077 **136** (112 mg, 84 %) als farblosen Feststoff.

HPLC: t_R = 8.30 min (99 %).

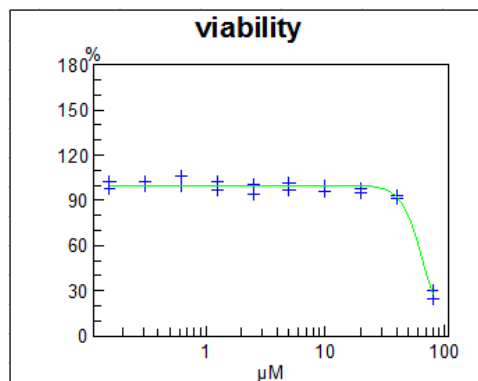
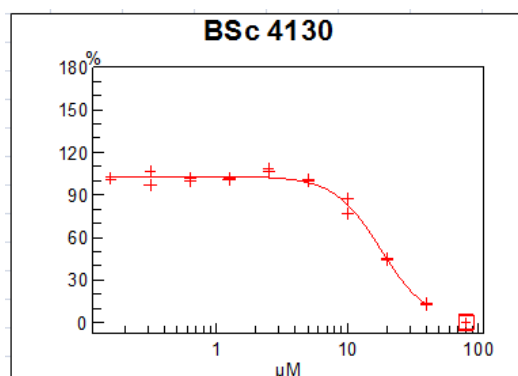
¹H-NMR (DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm, 500 MHz): δ = 12.26 (s, 1H), 8.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.41 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 7.31 – 7.19 (m, 3H), 7.20 – 7.11 (m, 3H), 5.70 – 5.60 (m, 2H), 3.83 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.44 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm, 126 MHz): δ = 175.3, 140.9, 140.2, 138.8, 137.4, 128.6, 127.3, 126.6, 125.3, 123.5, 123.4, 120.8, 120.2, 119.8, 119.1, 111.1, 108.6, 45.6, 45.3, 18.8 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 363 [M]⁺.

5.2.7. Biologische Evaluation der protonierten und deuterierten Carprofenderivate in Kapitel 3.1.4

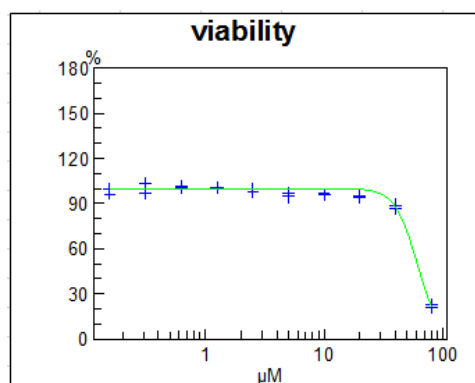
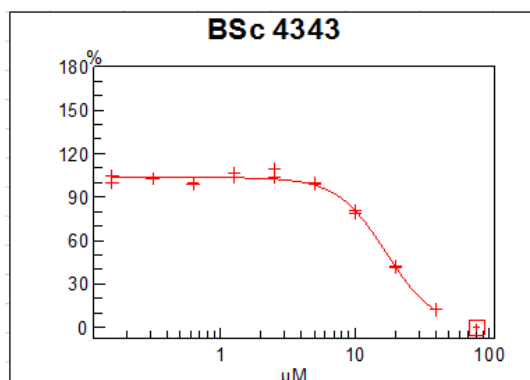
2-(6-Chlor-9-(4-(thioanisol)sulfonyl)-9*H*-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4130) 138



$$IC_{50}(A\beta_{42}) = 18 \mu M$$

Zelltoxizität bei 80 μM vorhanden.

2-(6-Chlor-9-(4-((methylthio-d₃)phenyl)sulfonyl)-9*H*-carbazol-2-yl)propansäure (BSc4343) 139



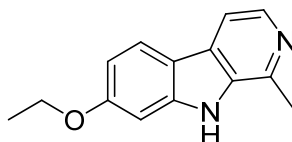
$$IC_{50}(A\beta_{42}) = 17 \mu M$$

Zelltoxizität bei 80 μM vorhanden

5.3. Beschreibung der Synthesen aus Kapitel 3.2

5.3.1. Synthese der DYRK1A-Inhibitoren

7-Ethoxy-1-methyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indol (BSc5073) 153¹⁴⁴



Harmol **28** (50 mg, 0.25 mmol) und Caesiumcarbonat (123 mg, 0.38 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in abs. DMF (5 mL) suspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf 0 °C gekühlt und Ethyltosylat (53 mg, 0.27 mmol) wurde zugegeben. Nach 1 h bei 0 °C wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Wasser wurde zugegeben und die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Automatisierte Flash-Chromatographie (RediSep Säule: 13 g C 18 Gold, Wasser : Acetonitril = 0 % → 95 % Acetonitril in 12 min) lieferte BSc5073 **153** (41 mg, 72 %) als farblosen Feststoff.

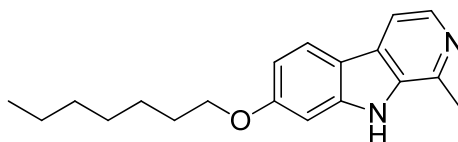
HPLC: t_R = 2.78 min (97 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 8.43 (bs, 1H), 8.32 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 4.12 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.79 (s, 3H), 1.47 (t, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): δ = 160.4, 141.9, 141.1, 139.1, 134.8, 128.9, 122.8, 116.0, 112.3, 110.3, 95.6, 64.0, 20.3, 15.0 ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 226[M]⁺.

7-Heptyloxy-1-methyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indol (BSc5071) 154



Harmol **28** (20 mg, 0.10 mmol) und Caesiumcarbonat (49 mg, 0.15 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in abs. DMF (3 mL) suspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf 0 °C gekühlt und Iodheptan (27 mg,

0.12 mmol) zugegeben. Nach 1 h bei 0 °C wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Wasser wurde zugegeben und die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Automatisierte Flash-Chromatographie (RediSep Säule: 13 g C 18 Gold, Wasser : Acetonitril = 0 % → 95 % Acetonitril in 12 min) lieferte BSc5071 **154** (15 mg, 50 %) als farblosen Feststoff.

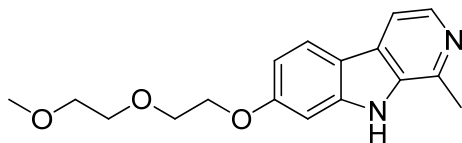
HPLC: t_R = 6.33 min (99 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 9.37 (bs, 1H), 8.26 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 4.03 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.87 (s, 3H), 1.89-1.76 (m, 2H), 1.54-1.42 (m, 2H), 1.42-1.22 (m, 6H), 0.91 (t, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): δ = 161.1, 142.8, 140.2, 136.8, 134.8, 129.7, 122.8, 115.5, 112.5, 111.1, 95.6, 68.7, 31.9, 29.4, 29.2, 26.2, 22.8, 19.5, 14.2 ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 296 [M]⁺.

7-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)-1-methyl-9H-pyrido[3,4-*b*]indol (BSc5041) **155**



Harmol **28** (50 mg, 0.25 mmol) und Caesiumcarbonat (120 mg, 0.37 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in abs. DMF (1 mL) suspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf 0 °C gekühlt und 2-(2-Methoxyethoxy)ethyltosylat **162a**^{278, 279} (76 mg, 0.27 mmol) zugegeben. Nach 1 h bei 0 °C wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Wasser wurde zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Automatisierte Flash-Chromatographie (RediSep Säule: 13 g C 18 Gold, Wasser : Acetonitril = 0 % → 95 % Acetonitril in 12 min) lieferte BSc5041 **155** (26 mg, 34 %) als farblosen Feststoff.

HPLC: t_R = 1.84 min (100 %).

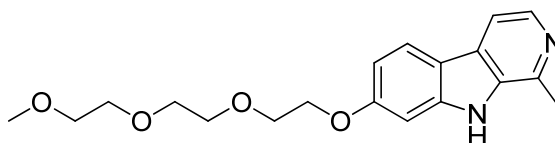
¹H NMR (Methanol-d₄, Methanol-d₃ = 3.31, 500 MHz): δ = 8.08 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.76 (dd, J = 5.5, 0.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.86 (dd,

$J = 8.7, 2.2 \text{ Hz}$, 1H), 4.23 - 4.18 (m, 2H), 3.90 - 3.85 (m, 2H), 3.74 - 3.68 (m, 2H), 3.60 - 3.54 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.74 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$, 125 MHz): $\delta = 161.6, 144.1, 142.1, 138.0, 136.3, 130.1, 123.5, 116.6, 113.3, 111.2, 110.9, 96.4, 73.0, 71.6, 70.8, 68.9, 59.1, 19.5$ ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 300[M] $^{+}$.

7-(2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-1-methyl-9H-pyrido[3,4-*b*]indol (BSc5042)
156



Harmol **28** (50 mg, 0.25 mmol) und Caesiumcarbonat (120 mg, 0.37 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in abs. DMF (1 mL) suspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung auf 0 °C gekühlt und 2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyltosylat **162b**^{278, 279} (86 mg, 0.27 mmol) zugegeben. Nach 1 h bei 0 °C wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Wasser wurde zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Automatisierte säulenchromatographische Reinigung (RediSep Säule: 13 g C 18 Gold, Wasser : Acetonitril = 0 % \rightarrow 95 % Acetonitril in 12 min) lieferte BSc5042 **156** (35 mg, 41 %) als farblosen Feststoff.

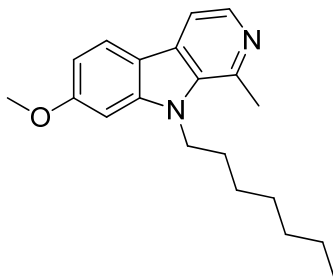
HPLC: $t_R = 1.85 \text{ min}$ (100 %).

^1H NMR (Methanol- d_4 , Methanol- $d_3 = 3.31$, 500 MHz): $\delta = 8.08$ (d, $J = 5.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H), 7.76 (t, $J = 3.8 \text{ Hz}$, 1H), 7.04 (d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H), 6.89 - 6.83 (m, 1H), 4.21 (q, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 2H), 3.91 - 3.84 (m, 2H), 3.74 - 3.57 (m, 6H), 3.52 - 3.46 (m, 2H), 3.33 - 3.25 (m, 3H), 2.74 (d, $J = 3.1 \text{ Hz}$, 3H) ppm.

^{13}C NMR (Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$, 125 MHz): $\delta = 161.7, 144.1, 142.1, 138.0, 136.3, 130.1, 123.6, 116.6, 113.3, 111.3, 96.5, 73.0, 71.8, 71.6, 71.4, 70.9, 69.0, 59.1, 19.5$ ppm.

MS (m/z, 70 eV, EI) = 344 [M] $^{+}$.

9-Heptylharmin (BSc5072) 157



Natriumhydrid (55 % Dispersion, 10 mg, 0.19 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in abs. DMF suspendiert und Harmin **25** (20 mg, 0.09 mmol) wurde zugegeben. Nach 30 min Voraktivierung wurde die Mischung auf 0 °C abgeköhlt und Iodheptan (20.1 μ l, 0.12 mmol) zugetropft. Die Suspension wurde 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weitergerührt. Wasser wurde zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Automatisierte Flash-Chromatographie (RediSep Säule: 13 g C 18 Gold, Wasser : Acetonitril = 0 % → 95 % Acetonitril in 12 min) lieferte BSc5072 **157** (27 mg, 95 %) als farblosen Feststoff.

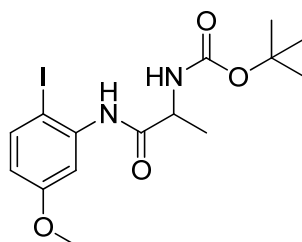
HPLC: t_R = 6.41 min (100 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 8.28 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.48 - 4.44 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.07 (s, 3H), 1.83 (dt, J = 15.5, 7.7 Hz, 2H), 1.45 - 1.27 (m, 8H), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): δ = 161.4, 143.7, 140.1, 137.0, 135.3, 130.2, 122.8, 115.2, 112.6, 109.3, 93.6, 55.9, 45.2, 31.8, 30.8, 29.0, 27.0, 22.7, 14.2 ppm.

MS (m/z , 70 eV, EI) = 310[M]⁺.

***tert*-Butyl-1-(2-iod-5-methoxyanilin)-1-oxopropan-2-yl-carbamat 168**



N-*tert*-Butoxycarbonyl-L-alanin **170** (91 mg, 0.48 mmol), DCC (100 mg, 0.482 mmol) und DMAP (12 mg, 0.10 mmol) wurden in DCM (1 mL) suspendiert und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. 2-Iod-5-methoxyanilin **169** (120 mg, 0.48 mmol) wurde in DCM (0.5 mL) gelöst und zu der Suspension getropft. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Celite filtriert. Es wurde mit 1N Salzsäure gespült. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Automatisierte säulenchromatographische Reinigung (RediSep Säule: 13 g C 18 Gold, Wasser : Acetonitril = 0 % → 95 % Acetonitril in 12 min) lieferte das Produkt **168** (12 mg, 6 %) als farblosen Feststoff.

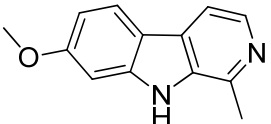
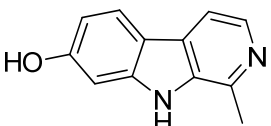
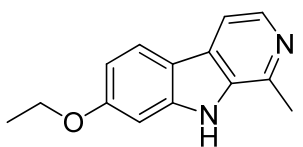
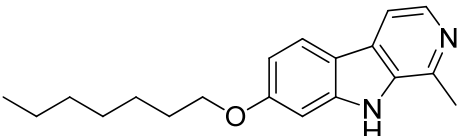
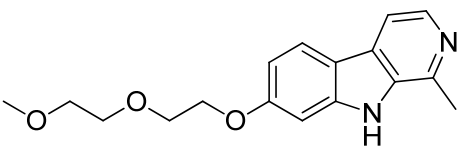
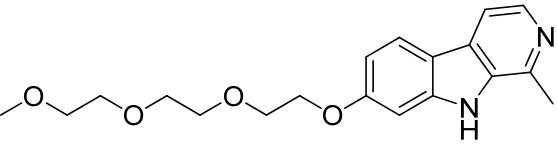
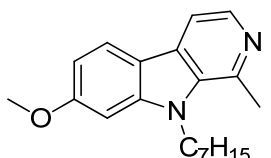
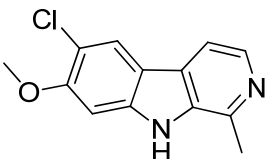
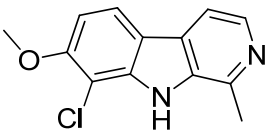
HPLC: t_R = 6.75 min (86 %).

¹H-NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm, 500 MHz): δ = 7.61 (dt, J = 8.8, 5.0 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 9.5, 2.0 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 5.00 (m, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.86 (d, J = 1.9 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.42 (d, J = 7.0 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm, 126 MHz): δ = 171.2, 158.6, 139.8, 139.2, 138.9, 113.5, 113.3, 103.3, 81.1, 79.1, 56.5, 55.7, 28.5, 17.3 ppm.

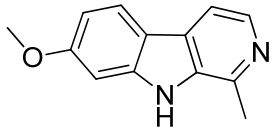
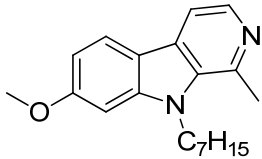
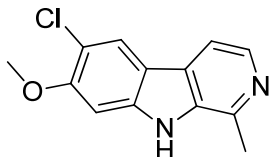
MS (m/z , 70 eV, EI) = 420[M]⁺.

5.3.2. Biologische Evaluation der DYRK1A-Inhibitoren

Substanz	BSc-Nummer	Strukturformel	%-Inhibition (DYRK1A) bei 10 μM^a
25 (Harmin)	BSc4965		97.3 \pm 1.1
28 (Harmol)	BSc4965		99.3 \pm 1.1
153	BSc5073		92.4 \pm 0.6
154	BSc5071		84.2 \pm 0.4
155	BSc5041		90.9 \pm 1.1
156	BSc5042		88.9 \pm 1.1
157	BSc5072		97.6 \pm 1.7
158	BSc5049		95.0 \pm 1.1
159	BSc5048		91.2 \pm 0.2

^a %-Inhibition zur Kontroll-spezifischen-Aktivität = 100-[gemessene Aktivität der Substanz/Aktivität der Kontrolle)*100] bei einer Konzentration von 10 μM der Testsubstanz.

5.3.3. Biologische Evaluation der DYRK1A-Inhibitoren in Bezug auf MAO-A

Substanz	BSc-Nummer	Strukturformel	%-Inhibition (MAO-A) bei 1 μM^a
25 (Harmin)	BSc4965		103.4 \pm 0.0
157	BSc5072		12.7 \pm 0.4
158	BSc5049		79.9 \pm 3.3

^a %-Inhibition zur Kontroll-spezifischen-Aktivität = 100-[(gemessene Aktivität der Substanz/Aktivität der Kontrolle)*100] bei einer Konzentration von 10 μM der Testsubstanz.

6. Literaturverzeichnis

1. Maurer, K.; Maurer, U. *Alzheimer - Das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit*: Piper Verlag GmbH, München 1998, 1999.
2. Prince, M.; Jackson, J. *Alzheimer's Disease International* **2009**.
3. Reitz, C.; Brayne, C.; Mayeux, R. *Nature reviews. Neurology* **2011**, 7, 137.
4. Folstein, M. F.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. *Journal of Psychiatric Research* **1975**, 12, 189.
5. Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, 48, 3030.
6. Galimberti, D.; Scarpini, E. *J Neurol* **2012**, 259, 201.
7. Förstl, H.; Kurz, A. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences* **1999**, 249, 288.
8. Sjobeck, M.; Haglund, M.; Englund, E. *International journal of geriatric psychiatry* **2005**, 20, 919.
9. Smith, A. D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99, 4135.
10. Hardy, J. A.; Higgins, G. A. *Science* **1992**, 256, 184.
11. Annaert, W.; De Strooper, B. *Annual review of cell and developmental biology* **2002**, 18, 25.
12. Braak, H.; Braak, E. *Acta neuropathologica* **1991**, 82, 239.
13. Braak, H.; Braak, E.; Bohl, J. *European neurology* **1993**, 33, 403.
14. Khan, U. A.; Liu, L.; Provenzano, F. A.; Berman, D. E.; Profaci, C. P.; Sloan, R.; Mayeux, R.; Duff, K. E.; Small, S. A. *Nature Neuroscience* **2014**, 17, 304.
15. Boländer, A.; Kieser, D.; Voss, C.; Bauer, S.; Schön, C.; Burgold, S.; Bittner, T.; Hölzer, J.; Heyny-von Haußen, R.; Mall, G.; Goetschy, V.; Czech, C.; Knust, H.; Berger, R.; Herms, J.; Hilger, I.; Schmidt, B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 9170.
16. Thal, D. R.; Rub, U.; Schultz, C.; Sassin, I.; Ghebremedhin, E.; Del Tredici, K.; Braak, E.; Braak, H. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2000**, 59, 733.
17. Thal, D. R.; Rub, U.; Orantes, M.; Braak, H. *Neurology* **2002**, 58, 1791.
18. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. *Lancet neurology* **2010**, 9, 702.
19. Danuello, A.; Romeiro, N. C.; Giesel, G. M.; Pivatto, M.; Viegas Jr., C.; Verli, H.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Castro, N. G.; Bolzani, V. S. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, 23, 163.
20. Seow, D.; Gauthier, S. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie* **2007**, 52, 620.
21. Schmitt, F.; Ryan, M.; Cooper, G. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2007**, 3, 135.
22. Karran, E.; Mercken, M.; Strooper, B. D. *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, 10, 698.
23. Lesné, S.; Koh, M. T.; Kotilinek, L.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Yang, A.; Gallagher, M.; Ashe, K. H. *Nature* **2006**, 440, 352.
24. Gong, Y.; Chang, L.; Viola, K. L.; Lacor, P. N.; Lambert, M. P.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 10417.
25. Tanzi, R. E. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**, 2.
26. Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T., Jr. *Biochemistry* **1993**, 32, 4693.
27. Wolfe, M. S. *Biochemistry* **2006**, 45, 7931.
28. Schmidt, B.; Baumann, S.; Braun, H. A.; Larbig, G. *Current topics in medicinal chemistry* **2006**, 6, 377.
29. LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, 8, 499.
30. Konietzko, U. *Current Alzheimer research* **2012**, 9, 200.

31. Qi-Takahara, Y.; Morishima-Kawashima, M.; Tanimura, Y.; Dolios, G.; Hirotsani, N.; Horikoshi, Y.; Kametani, F.; Maeda, M.; Saido, T. C.; Wang, R.; Ihara, Y. *The Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, 436.
32. Crump, C. J.; Johnson, D. S.; Li, Y.-M. *Biochemistry* **2013**.
33. Mazanetz, M. P.; Fischer, P. M. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, 464.
34. Buee, L.; Bussiere, T.; Buee-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R. *Brain research. Brain research reviews* **2000**, *33*, 95.
35. Planel, E.; Sun, X.; Takashima, A. *Drug Development Research* **2002**, *56*, 491.
36. Wang, J.-Z.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. *European Journal of Neuroscience* **2007**, *25*, 59.
37. Khatoon, S.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. *Journal of neurochemistry* **1992**, *59*, 750.
38. Schneider, A.; Mandelkow, E. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2008**, *5*, 443.
39. Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H. *Neuro-degenerative diseases* **2006**, *3*, 275.
40. Sato, T.; Diehl, T. S.; Narayanan, S.; Funamoto, S.; Ihara, Y.; De Strooper, B.; Steiner, H.; Haass, C.; Wolfe, M. S. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282*, 33985.
41. De Strooper, B.; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Vanderstichele, H.; Guhde, G.; Annaert, W.; Von Figura, K.; Van Leuven, F. *Nature* **1998**, *391*, 387.
42. Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 305.
43. Yu, G.; Nishimura, M.; Arawaka, S.; Levitan, D.; Zhang, L.; Tandon, A.; Song, Y. Q.; Rogaeva, E.; Chen, F.; Kawarai, T.; Supala, A.; Levesque, L.; Yu, H.; Yang, D. S.; Holmes, E.; Milman, P.; Liang, Y.; Zhang, D. M.; Xu, D. H.; Sato, C.; Rogaev, E.; Smith, M.; Janus, C.; Zhang, Y.; Aebersold, R.; Farrer, L. S.; Sorbi, S.; Bruni, A.; Fraser, P.; St George-Hyslop, P. *Nature* **2000**, *407*, 48.
44. Shah, S.; Lee, S. F.; Tabuchi, K.; Hao, Y. H.; Yu, C.; LaPlant, Q.; Ball, H.; Dann, C. E., 3rd; Sudhof, T.; Yu, G. *Cell* **2005**, *122*, 435.
45. Takasugi, N.; Tomita, T.; Hayashi, I.; Tsuruoka, M.; Niimura, M.; Takahashi, Y.; Thinakaran, G.; Iwatsubo, T. *Nature* **2003**, *422*, 438.
46. Kimberly, W. T.; LaVoie, M. J.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 6382.
47. Lazarov, V. K.; Fraering, P. C.; Ye, W.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J.; Li, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 6889.
48. Haapasalo, A.; Kovacs, D. M. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2011**, *25*, 3.
49. Golde, T. E.; Koo, E. H.; Felsenstein, K. M.; Osborne, B. A.; Miele, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828*, 2898.
50. Shih, I.-M.; Wang, T.-L. *Cancer Research* **2007**, *67*, 1879.
51. Wolfe, M. S. *Journal of neurochemistry* **2012**, *120*, 89.
52. Oehrich, D.; Berthelot, D. J. C.; Gijzen, H. J. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *54*, 669.
53. Dovey, H. F.; John, V.; Anderson, J. P.; Chen, L. Z.; de Saint Andrieu, P.; Fang, L. Y.; Freedman, S. B.; Folmer, B.; Goldbach, E.; Holsztynska, E. J.; Hu, K. L.; Johnson-Wood, K. L.; Kennedy, S. L.; Kholodenko, D.; Knops, J. E.; Latimer, L. H.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I. M.; Motter, R. N.; Mutter, L. C.; Nietz, J.; Quinn, K. P.; Sacchi, K. L.; Seubert, P. A.; Shopp, G. M.; Thorsett, E. D.; Tung, J. S.; Wu, J.; Yang, S.; Yin, C. T.; Schenk, D. B.; May, P. C.; Altstiel, L. D.; Bender, M. H.; Boggs, L. N.; Britton, T. C.; Clemens, J. C.; Czilli, D. L.; Dieckman-McGinty, D. K.; Droste, J. J.; Fuson, K. S.; Gitter, B. D.; Hyslop, P. A.; Johnstone, E. M.; Li, W. Y.; Little, S. P.; Mabry, T. E.; Miller, F. D.; Audia, J. E. *Journal of neurochemistry* **2001**, *76*, 173.
54. Lanz, T. A.; Himes, C. S.; Pallante, G.; Adams, L.; Yamazaki, S.; Amore, B.; Merchant, K. M. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2003**, *305*, 864.
55. Geling, A.; Steiner, H.; Willem, M.; Bally-Cuif, L.; Haass, C. *EMBO reports* **2002**, *3*, 688.

56. May, P.; Altstiel, L.; Bender, M.; Boggs, L.; Calligaro, D.; Fuson, K.; Gitter, B.; Hyslop, P.; Jordan, W.; Kallman, M.; Li, W.; Mabry, T.; Mark, R.; Ni, B.; Nissen, J.; Porter, W.; Sorgen, S.; Su, Y.; Audia, J.; Dovey, H.; Games, D.; John, V.; Freedman, S.; Guido, T.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Latimer, L.; Lieberbnurg, I.; Seubert, P.; Thorsett, E.; Soriano, F.; Schenk, D. *Neurobiology of Aging* **2002**, *23*, S133.
57. Wong, G. T.; Manfra, D.; Poulet, F. M.; Zhang, Q.; Josien, H.; Bara, T.; Engstrom, L.; Pinzon-Ortiz, M.; Fine, J. S.; Lee, H. J.; Zhang, L.; Higgins, G. A.; Parker, E. M. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 12876.
58. Wu, W.-L.; Zhang, L. *Drug Development Research* **2009**, *70*, 94.
59. Lanz, T. A.; Karmilowicz, M. J.; Wood, K. M.; Pozdnyakov, N.; Du, P.; Piotrowski, M. A.; Brown, T. M.; Nolan, C. E.; Richter, K. E.; Finley, J. E.; Fei, Q.; Ebbinghaus, C. F.; Chen, Y. L.; Spracklin, D. K.; Tate, B.; Geoghegan, K. F.; Lau, L. F.; Auperin, D. D.; Schachter, J. B. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2006**, *319*, 924.
60. Doody, R. S.; Raman, R.; Farlow, M.; Iwatsubo, T.; Vellas, B.; Joffe, S.; Kieburtz, K.; He, F.; Sun, X.; Thomas, R. G.; Aisen, P. S.; Siemers, E.; Sethuraman, G.; Mohs, R. *The New England journal of medicine* **2013**, *369*, 341.
61. Barten, D. M.; Guss, V. L.; Corsa, J. A.; Loo, A.; Hansel, S. B.; Zheng, M.; Munoz, B.; Srinivasan, K.; Wang, B.; Robertson, B. J.; Polson, C. T.; Wang, J.; Roberts, S. B.; Hendrick, J. P.; Anderson, J. J.; Loy, J. K.; Denton, R.; Verdoorn, T. A.; Smith, D. W.; Felsenstein, K. M. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2005**, *312*, 635.
62. Zhao, B.; Yu, M.; Neitzel, M.; Marugg, J.; Jagodzinski, J.; Lee, M.; Hu, K.; Schenk, D.; Yednock, T.; Basi, G. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 2927.
63. Best, J. D.; Jay, M. T.; Otu, F.; Churcher, I.; Reilly, M.; Morentin-Gutierrez, P.; Pattison, C.; Harrison, T.; Shearman, M. S.; Attack, J. R. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2006**, *317*, 786.
64. Best, J. D.; Smith, D. W.; Reilly, M. A.; O'Donnell, R.; Lewis, H. D.; Ellis, S.; Wilkie, N.; Rosahl, T. W.; Laroque, P. A.; Boussiquet-Leroux, C.; Churcher, I.; Attack, J. R.; Harrison, T.; Shearman, M. S. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2007**, *320*, 552.
65. Weggen, S.; Eriksen, J. L.; Das, P.; Sagi, S. A.; Wang, R.; Pietrzik, C. U.; Findlay, K. A.; Smith, T. E.; Murphy, M. P.; Bulter, T.; Kang, D. E.; Marquez-Sterling, N.; Golde, T. E.; Koo, E. H. *Nature* **2001**, *414*, 212.
66. Younkin, S. G. *Journal of physiology, Paris* **1998**, *92*, 289.
67. Eriksen, J. L.; Sagi, S. A.; Smith, T. E.; Weggen, S.; Das, P.; McLendon, D. C.; Ozols, V. V.; Jessing, K. W.; Zavitz, K. H.; Koo, E. H.; Golde, T. E. *The Journal of clinical investigation* **2003**, *112*, 440.
68. Beher, D.; Clarke, E. E.; Wrigley, J. D.; Martin, A. C.; Nadin, A.; Churcher, I.; Shearman, M. S. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 43419.
69. Green, R. C.; Schneider, L. S.; Amato, D. A.; Beelen, A. P.; Wilcock, G.; Swabb, E. A.; Zavitz, K. H. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **2009**, *302*, 2557.
70. Peretto, I.; Radaelli, S.; Parini, C.; Zandi, M.; Raveglia, L. F.; Dondio, G.; Fontanella, L.; Misiano, P.; Bigogno, C.; Rizzi, A.; Riccardi, B.; Biscailoli, M.; Marchetti, S.; Puccini, P.; Catinella, S.; Rondelli, I.; Cenacchi, V.; Bolzoni, P. T.; Caruso, P.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Del Giudice, E.; Moretto, N.; Imbimbo, B. P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5705.
71. Imbimbo, B. P.; Frigerio, E.; Breda, M.; Fiorentini, F.; Fernandez, M.; Sivilia, S.; Giardino, L.; Calza, L.; Norris, D.; Casula, D.; Shenouda, M. *Alzheimer disease and associated disorders* **2013**, *27*, 278.
72. Imbimbo, B. P.; Del Giudice, E.; Cenacchi, V.; Volta, R.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Riccardi, B.; Puccini, P.; Moretto, N.; Grassi, F.; Ottonello, S.; Leon, A. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **2007**, *55*, 318.

73. Imbimbo, B. P.; Hutter-Paier, B.; Villetti, G.; Facchinetti, F.; Cenacchi, V.; Volta, R.; Lanzillotta, A.; Pizzi, M.; Windisch, M. *British journal of pharmacology* **2009**, *156*, 982.
74. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01723670?term=CHF5074&rank=7>. 05.12.2013.
75. Hashimoto, T.; Ishibashi, A.; Hagiwara, H.; Murata, Y.; Takenaka, O.; Miyagawa, T. *Alzheimer's & Dementia* **2010**, *6*, S242.
76. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01221259?term=E2212&rank=1>. 05.12.2013.
77. Nakano-Ito, K.; Fujikawa, Y.; Hihara, T.; Shinjo, H.; Kotani, S.; Suganuma, A.; Aoki, T.; Tsukidate, K. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2013**.
78. Ricketts, A. P.; Lundy, K. M.; Seibel, S. B. *American journal of veterinary research* **1998**, *59*, 1441.
79. Narlawar, R.; Pérez Revuelta, B. I.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B.; Baumann, K. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 7588.
80. Kukar, T. L.; Ladd, T. B.; Robertson, P.; Pintchovski, S. A.; Moore, B.; Bann, M. A.; Ren, Z.; Jansen-West, K.; Malphrus, K.; Eggert, S.; Maruyama, H.; Cottrell, B. A.; Das, P.; Basi, G. S.; Koo, E. H.; Golde, T. E. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 39804.
81. Narlawar, R.; Pérez Revuelta, B. I.; Baumann, K.; Schubnel, R.; Haass, C.; Steiner, H.; Schmidt, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 176.
82. Baumann, S.; Höttecke, N.; Schubnel, R.; Baumann, K.; Schmidt, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 6986.
83. Naumann, E. C.; Göring, S.; Ogorek, I.; Weggen, S.; Schmidt, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 3852.
84. Kukar, T.; Murphy, M. P.; Eriksen, J. L.; Sagi, S. A.; Weggen, S.; Smith, T. E.; Ladd, T.; Khan, M. A.; Kache, R.; Beard, J.; Dodson, M.; Merit, S.; Ozols, V. V.; Anastasiadis, P. Z.; Das, P.; Fauq, A.; Koo, E. H.; Golde, T. E. *Nature medicine* **2005**, *11*, 545.
85. Gasparini, L.; Rusconi, L.; Xu, H.; del Soldato, P.; Ongini, E. *Journal of neurochemistry* **2004**, *88*, 337.
86. Becker, W.; Joost, H. G. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **1999**, *62*, 1.
87. Becker, W.; Weber, Y.; Wetzel, K.; Eirnbter, K.; Tejedor, F. J.; Joost, H.-G. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 25893.
88. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, *298*, 1912.
89. Himpel, S.; Panzer, P.; Eirnbter, K.; Czajkowska, H.; Sayed, M.; Packman, L. C.; Blundell, T.; Kentrup, H.; Grotzinger, J.; Joost, H. G.; Becker, W. *Biochemical Journal* **2001**, *359*, 497.
90. Becker, W.; Sippl, W. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 246.
91. Adayev, T.; Wegiel, J.; Hwang, Y.-W. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2011**, *507*, 212.
92. <http://www.piercenet.com/method/phosphorylation>. Vol. 03.01.2014.
93. Park, J.; Song, W.-J.; Chung, K. *Cellular and Molecular Life Science* **2009**, *66*, 3235.
94. Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; Hosoya, T.; Ito, N.; Hagiwara, M. *Nature Communications* **2010**, *1*, 86.
95. Ferrer, I.; Barrachina, M.; Puig, B.; Martínez de Lagrán, M.; Martí, E.; Avila, J.; Dierssen, M. *Neurobiology of Disease* **2005**, *20*, 392.
96. Smith, B.; Medda, F.; Gokhale, V.; Dunckley, T.; Hulme, C. *ACS Chemical Neuroscience* **2012**, *3*, 857.
97. Guimera, J.; Casas, C.; Estivill, X.; Pritchard, M. *Genomics* **1999**, *57*, 407.

98. Song, W. J.; Sternberg, L. R.; Kasten-Sportes, C.; Keuren, M. L.; Chung, S. H.; Slack, A. C.; Miller, D. E.; Glover, T. W.; Chiang, P. W.; Lou, L.; Kurnit, D. M. *Genomics* **1996**, *38*, 331.
99. Hammerle, B.; Elizalde, C.; Tejedor, F. J. *The European journal of neuroscience* **2008**, *27*, 1061.
100. Alvarez, M.; Estivill, X.; de la Luna, S. *Journal of cell science* **2003**, *116*, 3099.
101. Kang, J. E.; Choi, S. A.; Park, J. B.; Chung, K. C. *Journal of neuroscience research* **2005**, *81*, 62.
102. Kim, E. J.; Sung, J. Y.; Lee, H. J.; Rhim, H.; Hasegawa, M.; Iwatsubo, T.; Min do, S.; Kim, J.; Paik, S. R.; Chung, K. C. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281*, 33250.
103. Wegiel, J.; Gong, C.-X.; Hwang, Y.-W. *FEBS Journal* **2011**, *278*, 236.
104. Kimura, R.; Kamino, K.; Yamamoto, M.; Nuripa, A.; Kida, T.; Kazui, H.; Hashimoto, R.; Tanaka, T.; Kudo, T.; Yamagata, H.; Tabara, Y.; Miki, T.; Akatsu, H.; Kosaka, K.; Funakoshi, E.; Nishitomi, K.; Sakaguchi, G.; Kato, A.; Hattori, H.; Uema, T.; Takeda, M. *Human molecular genetics* **2007**, *16*, 15.
105. Ryoo, S. R.; Jeong, H. K.; Radnaabazar, C.; Yoo, J. J.; Cho, H. J.; Lee, H. W.; Kim, I. S.; Cheon, Y. H.; Ahn, Y. S.; Chung, S. H.; Song, W. J. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282*, 34850.
106. Woods, Y. L.; Cohen, P.; Becker, W.; Jakes, R.; Goedert, M.; Wang, X.; Proud, C. G. *Biochemical Journal* **2001**, *355*, 609.
107. Frost, D.; Meechoovet, B.; Wang, T.; Gately, S.; Giorgetti, M.; Shcherbakova, I.; Dunkley, T. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19264.
108. Shi, J.; Zhang, T.; Zhou, C.; Chohan, M. O.; Gu, X.; Wegiel, J.; Zhou, J.; Hwang, Y. W.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C. X.; Liu, F. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 28660.
109. Ryoo, S. R.; Cho, H. J.; Lee, H. W.; Jeong, H. K.; Radnaabazar, C.; Kim, Y. S.; Kim, M. J.; Son, M. Y.; Seo, H.; Chung, S. H.; Song, W. J. *Journal of neurochemistry* **2008**, *104*, 1333.
110. Ryu, Y. S.; Park, S. Y.; Jung, M. S.; Yoon, S. H.; Kwen, M. Y.; Lee, S. Y.; Choi, S. H.; Radnaabazar, C.; Kim, M. K.; Kim, H.; Kim, K.; Song, W. J.; Chung, S. H. *Journal of neurochemistry* **2010**, *115*, 574.
111. Patel, K.; Gadewar, M.; Tripathi, R.; Prasad, S. K.; Patel, D. K. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2012**, *2*, 660.
112. Wang, X.; Geng, Y.; Wang, D.; Shi, X.; Liu, J. *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 3543.
113. Kawanishi, K.; Saiki, K.; Tomita, H.; Tachibana, Y.; Farnsworth, N. R.; Bohike, M. *Advances in Mass Spectrometry* **1998**, *14*, D053560/1.
114. Samoylenko, V.; Rahman, M. M.; Tekwani, B. L.; Tripathi, L. M.; Wang, Y.-H.; Khan, S. I.; Khan, I. A.; Miller, L. S.; Joshi, V. C.; Muhammad, I. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *127*, 357.
115. Gockler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F. J.; Becker, W. *The FEBS journal* **2009**, *276*, 6324.
116. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J. S. C.; Alessi, D. R.; Cohen, P. *Biochemical Journal* **2007**, *408*, 297.
117. Sanchez, C.; Salas, A. P.; Brana, A. F.; Palomino, M.; Pineda-Lucena, A.; Carbajo, R. J.; Mendez, C.; Moris, F.; Salas, J. A. *Chemical Communications* **2009**, 4118.
118. Rosenthal, A. S.; Tanega, C.; Shen, M.; Mott, B. T.; Bougie, J. M.; Nguyen, D.-T.; Misteli, T.; Auld, D. S.; Maloney, D. J.; Thomas, C. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 3152.
119. Rosse, G. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 502.
120. Marti, G.; Eparvier, V.; Morleo, B.; Ven, J.; Apel, C.; Bodo, B.; Amand, S.; Dumontet, V.; Lozach, O.; Meijer, L.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Molecules* **2013**, *18*, 3018.

-
121. Cozza, G.; Mazzorana, M.; Papinutto, E.; Bain, J.; Elliott, M.; di Maira, G.; Gianoncelli, A.; Pagano, M. A.; Sarno, S.; Ruzzene, M.; Battistutta, R.; Meggio, F.; Moro, S.; Zagotto, G.; Pinna, L. A. *Biochemical Journal* **2009**, 421, 387.
 122. Ahmadu, A.; Abdulkarim, A.; Grougnet, R.; Myrianthopoulos, V.; Tillequin, F.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L. *Planta medica* **2010**, 76, 458.
 123. Koo, K. A.; Kim, N. D.; Chon, Y. S.; Jung, M. S.; Lee, B. J.; Kim, J. H.; Song, W. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 2324.
 124. Myrianthopoulos, V.; Kritsanida, M.; Gaboriaud-Kolar, N.; Magiatis, P.; Ferandin, Y.; Durieu, E.; Lozach, O.; Cappel, D.; Soundararajan, M.; Filippakopoulos, P.; Sherman, W.; Knapp, S.; Meijer, L.; Mikros, E.; Skaltsounis, A.-L. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 4, 22.
 125. Giraud, F.; Alves, G.; Debiton, E.; Nauton, L.; Thery, V.; Durieu, E.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Meijer, L.; Anizon, F.; Pereira, E.; Moreau, P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54, 4474.
 126. Kassis, P.; Brzeszcz, J.; Beneteau, V.; Lozach, O.; Meijer, L.; Le Guevel, R.; Guillouzo, C.; Lewinski, K.; Bourg, S.; Colliandre, L.; Routier, S.; Merour, J. Y. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 5416.
 127. Schmidt, A. W.; Reddy, K. R.; Knölker, H.-J. *Chemical Reviews* **2012**, 112, 3193.
 128. Knölker, H.-J.; Reddy, K. R. *Chemical Reviews* **2002**, 102, 4303.
 129. Bandgar, B. P.; Adsul, L. K.; Chavan, H. V.; Jalde, S. S.; Shringare, S. N.; Shaikh, R.; Meshram, R. J.; Gacche, R. N.; Masand, V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 5839.
 130. Zhu, D.; Chen, M.; Li, M.; Luo, B.; Zhao, Y.; Huang, P.; Xue, F.; Rapposelli, S.; Pi, R.; Wen, S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 68, 81.
 131. Tang, Y.-Z.; Liu, Z.-Q. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 1903.
 132. Noguchi, N.; Nishino, K.; Niki, E. *Biochemical Pharmacology* **2000**, 59, 1069.
 133. Thiramatrakul, S.; Yenjai, C.; Waiwut, P.; Vajragupta, O.; Reubroycharoen, P.; Tohda, M.; Boonyarat, C. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 75, 21.
 134. Yang, W.; Wong, Y.; Ng, O. T. W.; Bai, L.-P.; Kwong, D. W. J.; Ke, Y.; Jiang, Z.-H.; Li, H.-W.; Yung, K. K. L.; Wong, M. S. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 1804.
 135. Kumar, A. B.; Anderson, J. M.; Melendez, A. L.; Manetsch, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 4740.
 136. Smirnova, O. B.; Golovko, T. V.; Granik, V. G. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2011**, 44, 654.
 137. Wang, Y.; Jiang, Y.; Zhang, M.; Shen, Y. *Huaxue Xuebao* **2012**, 70, 1974.
 138. Cao, L.-H.; Zhang, W.; Luo, J.-G.; Kong, L.-Y. *Helvetica Chimica Acta* **2012**, 95, 1018.
 139. Liu, L.; Xu, Y. Y.; Yang, Z. Q.; Xiang, J. N.; Xu, G. Y. *Chinese Chemical Letters* **2012**, 23, 1230.
 140. Wang, S.; Wang, Y.; Liu, W.; Liu, N.; Zhang, Y.; Dong, G.; Liu, Y.; Li, Z.; He, X.; Miao, Z.; Yao, J.; Li, J.; Zhang, W.; Sheng, C. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2014**.
 141. Frederich, M.; Tits, M.; Angenot, L. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2008**, 102, 11.
 142. Finberg, J. P. M. *Pharmacology & therapeutics*.
 143. Lenders, J. W.; Eisenhofer, G.; Abeling, N. G.; Berger, W.; Murphy, D. L.; Konings, C. H.; Wagemakers, L. M.; Kopin, I. J.; Karoum, F.; van Gennip, A. H.; Brunner, H. G. *The Journal of clinical investigation* **1996**, 97, 1010.
 144. Song, Y.; Wang, J.; Teng, S. F.; Kesuma, D.; Deng, Y.; Duan, J.; Wang, J. H.; Qi, R. Z.; Sim, M. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12, 1129.
 145. Song, H.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Wang, Q. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 1010.
-

-
146. Zhang, H.; Sun, K.; Ding, J.; Xu, H.; Zhu, L.; Zhang, K.; Li, X.; Sun, W. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 348.
147. Li, Q.; Cao, M.-r.; Liu, Z.-l.; Jiang, J.-w. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi* **2013**, *29*, 284.
148. Xia, C.-F.; Arteaga, J.; Chen, G.; Gangadharmath, U.; Gomez, L. F.; Kasi, D.; Lam, C.; Liang, Q.; Liu, C.; Mocharla, V. P.; Mu, F.; Sinha, A.; Su, H.; Szardenings, A. K.; Walsh, J. C.; Wang, E.; Yu, C.; Zhang, W.; Zhao, T.; Kolb, H. C. *Alzheimer's & Dementia* **2013**, *9*, 666.
149. Szardenings, A. K.; Kolb, H. C.; Walsh, J. C.; Chen, G.; Gangadharmath, U. B.; Kasi, D.; Liu, C.; Sinha, A.; Wang, E.; Yu, C.; Zhang, W.; Chen, K.; Mocharla, V. P.; Scott, P. J. H. US20120302755A1; **2012**, 85pp.
150. Chakraborty, D. P.; Barman, B. K.; Bose, P. K. *Tetrahedron* **1965**, *21*, 681.
151. Das, K. C.; Chakraborty, D. P.; Bose, P. K. *Experientia* **1965**, *21*, 340.
152. Cadogan, J. I. G.; Cameron-Wood, M.; Mackie, R. K.; Searle, R. J. G. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1965**, 4831.
153. Kureel, S. P.; Kapil, R. S.; Popli, S. P. *Journal of the Chemical Society D* **1969**, 1120.
154. Goldberg, I. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 1691.
155. Ullmann, F. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1903**, *36*, 2382.
156. Ley, S. V.; Thomas, A. W. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 5400.
157. Ullmann, F. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1904**, *37*, 853.
158. Hartwig, J. F. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2046.
159. Buchwald, S. L.; Mauger, C.; Mignani, G.; Scholz, U. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348*, 23.
160. Schmidt, M.; Knölker, H.-J. *Synlett* **2009**, *2009*, 2421.
161. Akermarck, B.; Ebersson, L.; Jonsson, E.; Pettersson, E. *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, *40*, 1365.
162. Knölker, H.-J.; O'Sullivan, N. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10893.
163. Knölker, H.-J.; Reddy, K. R.; Wagner, A. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 8267.
164. Knolker, H.-J.; Frohner, W. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, 173.
165. Robinson, B. *Chemical Reviews* **1963**, *63*, 373.
166. Robinson, B. *Chemical Reviews* **1969**, *69*, 227.
167. Pictet, A.; Spengler, T. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1911**, *44*, 2030.
168. Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Current Medicinal Chemistry* **2007**, *14*, 479.
169. Zhang, G.; Cao, R.; Guo, L.; Ma, Q.; Fan, W.; Chen, X.; Li, J.; Shao, G.; Qiu, L.; Ren, Z. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *65*, 21.
170. Smith, P. A. S.; Boyer, J. H. *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73*, 2626.
171. Clark, V. M.; Cox, A.; Herbert, E. J. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1968**, 831.
172. Iwaki, T.; Yasuhara, A.; Sakamoto, T. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, 1505.
173. Moron, J.; Landras, C.; Bisagni, E. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1992**, *29*, 1573.
174. Endres, K.; Fahrenholz, F. *Exp Brain Res* **2012**, *217*, 343.
175. Edwards, D. R.; Handsley, M. M.; Pennington, C. J. *Molecular Aspects of Medicine* **2008**, *29*, 258.
176. Reiss, K.; Saftig, P. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2009**, *20*, 126.
177. Pruessmeyer, J.; Ludwig, A. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2009**, *20*, 164.
178. Vingtdeux, V.; Marambaud, P. *Journal of neurochemistry* **2012**, *120*, 34.
179. Endres, K.; Fahrenholz, F. *FEBS Journal* **2010**, *277*, 1585.
180. Howard, L.; Lu, X.; Mitchell, S.; Griffiths, S.; Glynn, P. *Biochem. J.* **1996**, *317*, 45.
181. Kärkkäinen, I.; Rybníková, E.; Pelto-Huikko, M.; Huovila, A.-P. J. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2000**, *15*, 547.
-

182. Dallas, D. J.; Genever, P. G.; Patton, A. J.; Millichip, M. I.; McKie, N.; Skerry, T. M. *Bone* **1999**, *25*, 9.
183. Yamazaki, K.; Mizui, Y.; Tanaka, I. *Genomics* **1997**, *45*, 457.
184. Yamazaki, K.; Mizui, Y.; Sagane, K.; Tanaka, I. *Genomics* **1997**, *46*, 528.
185. Bass, R.; Edwards, D. R. *Biochemical Journal* **2010**, *428*, e3.
186. Takeda, S.; Igarashi, T.; Mori, H.; Araki, S. *The EMBO Journal* **2006**, *25*, 2388.
187. Anders, A.; Gilbert, S.; Garten, W.; Postina, R.; Fahrenholz, F. *The FASEB Journal* **2001**.
188. Moss, M. L.; Bomar, M.; Liu, Q.; Sage, H.; Dempsey, P.; Lenhart, P. M.; Gillispie, P. A.; Stoeck, A.; Wildeboer, D.; Bartsch, J. W.; Palmisano, R.; Zhou, P. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 35712.
189. Erez, E.; Fass, D.; Bibi, E. *Nature* **2009**, *459*, 371.
190. Janes, P. W.; Saha, N.; Barton, W. A.; Kolev, M. V.; Wimmer-Kleikamp, S. H.; Nievergall, E.; Blobel, C. P.; Himanen, J.-P.; Lackmann, M.; Nikolov, D. B. *Cell* **2005**, *123*, 291.
191. Smith, K. M.; Gaultier, A.; Cousin, H.; Alfandari, D.; White, J. M.; DeSimone, D. W. *The Journal of Cell Biology* **2002**, *159*, 893.
192. Milla, M. E.; Leesnitzer, M. A.; Moss, M. L.; Clay, W. C.; Carter, H. L.; Miller, A. B.; Su, J.-L.; Lambert, M. H.; Willard, D. H.; Sheeley, D. M.; Kost, T. A.; Burkhart, W.; Moyer, M.; Blackburn, R. K.; Pahel, G. L.; Mitchell, J. L.; Hoffman, C. R.; Becherer, J. D. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 30563.
193. White, J. M. *Current Opinion in Cell Biology* **2003**, *15*, 598.
194. Duffy, M. J.; McKiernan, E.; O'Donovan, N.; McGowan, P. M. *Clinica Chimica Acta* **2009**, *403*, 31.
195. Marcello, E.; Gardoni, F.; Mauceri, D.; Romorini, S.; Jeromin, A.; Epis, R.; Borroni, B.; Cattabeni, F.; Sala, C.; Padovani, A.; Di Luca, M. *The Journal of Neuroscience* **2007**, *27*, 1682.
196. Horiuchi, K.; Le Gall, S.; Schulte, M.; Yamaguchi, T.; Reiss, K.; Murphy, G.; Toyama, Y.; Hartmann, D.; Saftig, P.; Blobel, C. P. *Molecular Biology of the Cell* **2007**, *18*, 176.
197. Hartmann, D.; de Strooper, B.; Serneels, L.; Craessaerts, K.; Herreman, A.; Annaert, W.; Umans, L.; Lübke, T.; Lena Illert, A.; von Figura, K.; Saftig, P. *Human molecular genetics* **2002**, *11*, 2615.
198. Hattori, M.; Osterfield, M.; Flanagan, J. G. *Science* **2000**, *289*, 1360.
199. Reiss, K.; Maretzky, T.; Ludwig, A.; Tousseyn, T.; de Strooper, B.; Hartmann, D.; Saftig, P. *The EMBO Journal* **2005**, *24*, 742.
200. Stoeck, A.; Keller, S.; Riedle, S.; Sanderson, M. P.; Runz, S.; Le naour, F.; Gutwein, P.; Ludwig, A.; Rubinstein, E.; Altevogt, P. *Biochemical Journal* **2006**, *393*, 609.
201. Doherty, P.; Williams, E.; Walsh, F. S. *Neuron* **1995**, *14*, 57.
202. Matthews, V.; Schuster, B.; Schütze, S.; Bussmeyer, I.; Ludwig, A.; Hundhausen, C.; Sadowski, T.; Saftig, P.; Hartmann, D.; Kallen, K.-J.; Rose-John, S. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 38829.
203. Rose-John, S.; Scheller, J.; Elson, G.; Jones, S. A. *Journal of Leukocyte Biology* **2006**, *80*, 227.
204. McCulloch, D. R.; Akl, P.; Samaratunga, H.; Herington, A. C.; Odorico, D. M. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2004**, *10*, 314.
205. Gavert, N.; Sheffer, M.; Raveh, S.; Spaderna, S.; Shtutman, M.; Brabletz, T.; Barany, F.; Paty, P.; Notterman, D.; Domany, E.; Ben-Ze'ev, A. *Cancer Research* **2007**, *67*, 7703.
206. Ko, S.-Y.; Lin, S.-C.; Wong, Y.-K.; Liu, C.-J.; Chang, K.-W.; Liu, T.-Y. *Cancer Letters* **2007**, *245*, 33.
207. Sanderson, M. P.; Dempsey, P. J.; Dunbar, A. J. *Growth Factors* **2006**, *24*, 121.
208. Sahin, U.; Weskamp, G.; Kelly, K.; Zhou, H.-M.; Higashiyama, S.; Peschon, J.; Hartmann, D.; Saftig, P.; Blobel, C. P. *The Journal of Cell Biology* **2004**, *164*, 769.

-
209. Blobel, C. P. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2005**, 6, 32.
210. Hayes, D. F.; Yamauchi, H.; Broadwater, G.; Cirrincione, C. T.; Rodrigue, S. P.; Berry, D. A.; Younger, J.; Panasci, L. L.; Millard, F.; Duggan, D. B.; Norton, L.; Henderson, I. C. *Clinical Cancer Research* **2001**, 7, 2703.
211. Christianson, T. A.; Doherty, J. K.; Lin, Y. J.; Ramsey, E. E.; Holmes, R.; Keenan, E. J.; Clinton, G. M. *Cancer Research* **1998**, 58, 5123.
212. Codony-Servat, J.; Albanell, J.; Lopez-Talavera, J. C.; Arribas, J.; Baselga, J. *Cancer Research* **1999**, 59, 1196.
213. Postina, R. *Journal of neurochemistry* **2012**, 120 Suppl 1, 46.
214. Moss, M. L.; Stoeck, A.; Yan, W.; Dempsey, P. J. *Current pharmaceutical biotechnology* **2008**, 9, 2.
215. Prinzen, C.; Müller, U.; Endres, K.; Fahrenholz, F.; Postina, R. *The FASEB Journal* **2005**.
216. Tippmann, F.; Hundt, J.; Schneider, A.; Endres, K.; Fahrenholz, F. *The FASEB Journal* **2009**, 23, 1643.
217. Marcello, E.; Gardoni, F.; Di Luca, M.; Pérez-Otaño, I. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 10376.
218. Zimmermann, M.; Gardoni, F.; Marcello, E.; Colciaghi, F.; Borroni, B.; Padovani, A.; Cattabeni, F.; Di Luca, M. *Journal of neurochemistry* **2004**, 90, 1489.
219. Etcheberrigaray, R.; Tan, M.; Dewachter, I.; Kuipéri, C.; Van der Auwera, I.; Wera, S.; Qiao, L.; Bank, B.; Nelson, T. J.; Kozikowski, A. P.; Van Leuven, F.; Alkon, D. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 11141.
220. Hung, A. Y.; Haass, C.; Nitsch, R. M.; Qiu, W. Q.; Citron, M.; Wurtman, R. J.; Growdon, J. H.; Selkoe, D. J. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 22959.
221. Hongpaisan, J.; Sun, M. K.; Alkon, D. L. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2011**, 31, 630.
222. Magoulas, G. E.; Bariamis, S. E.; Athanassopoulos, C. M.; Haskopoulos, A.; Dedes, P. G.; Krokidis, M. G.; Karamanos, N. K.; Kletsas, D.; Papaioannou, D.; Maroulis, G. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 721.
223. Kedei, N.; Lewin, N. E.; Géczy, T.; Selezneva, J.; Braun, D. C.; Chen, J.; Herrmann, M. A.; Heldman, M. R.; Lim, L.; Mannan, P.; Garfield, S. H.; Poudel, Y. B.; Cummins, T. J.; Rudra, A.; Blumberg, P. M.; Keck, G. E. *ACS Chemical Biology* **2013**, 8, 767.
224. Askin, D.; Verhoeven, T. R.; Liu, T. M. H.; Shinkai, I. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4929.
225. Wolozin, B.; Kellman, W.; Ruosseau, P.; Celesia, G. G.; Siegel, G. *Archives of Neurology* **2000**, 57, 1439.
226. Jick, H.; Zornberg, G. L.; Jick, S. S.; Seshadri, S.; Drachman, D. A. *The Lancet* **2000**, 356, 1627.
227. Fassbender, K.; Simons, M.; Bergmann, C.; Stroick, M.; Lütjohann, D.; Keller, P.; Runz, H.; Köhl, S.; Bertsch, T.; von Bergmann, K.; Hennerici, M.; Beyreuther, K.; Hartmann, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98, 5856.
228. Kojro, E.; Gimpl, G.; Lammich, S.; März, W.; Fahrenholz, F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98, 5815.
229. Pressman, P.; Gottfried, J. A. *Neurology* **2012**, 79, e33.
230. Corrao, G.; Ibrahim, B.; Nicotra, F.; Zambon, A.; Merlino, L.; Pasini, T. S.; Catapano, A. L.; Mancina, G. *Atherosclerosis* **2010**, 230, 171.
231. Baker, A. H.; Edwards, D. R.; Murphy, G. *Journal of cell science* **2002**, 115, 3719.
232. Rapti, M.; Atkinson, S. J.; Lee, M. H.; Trim, A.; Moss, M.; Murphy, G. *Biochemical Journal* **2008**, 411, 433.
233. Wei, S.; Kashiwagi, M.; Kota, S.; Xie, Z.; Nagase, H.; Brew, K. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280, 32877.

-
234. Muraguchi, T.; Takegami, Y.; Ohtsuka, T.; Kitajima, S.; Chandana, E. P. S.; Omura, A.; Miki, T.; Takahashi, R.; Matsumoto, N.; Ludwig, A.; Noda, M.; Takahashi, C. *Nature Neuroscience* **2007**, *10*, 838.
235. Hoettecke, N.; Ludwig, A.; Foro, S.; Schmidt, B. *Neurodegenerative Diseases* **2010**, *7*, 232.
236. Zhou, B. B.; Peyton, M.; He, B.; Liu, C.; Girard, L.; Caudler, E.; Lo, Y.; Baribaud, F.; Mikami, I.; Reguart, N.; Yang, G.; Li, Y.; Yao, W.; Vaddi, K.; Gazdar, A. F.; Friedman, S. M.; Jablons, D. M.; Newton, R. C.; Fridman, J. S.; Minna, J. D.; Scherle, P. A. *Cancer cell* **2006**, *10*, 39.
237. *Drugs in R&D* **2003**, *4*, 198.
238. Fridman, J. S.; Caulder, E.; Hansbury, M.; Liu, X.; Yang, G.; Wang, Q.; Lo, Y.; Zhou, B.-B.; Pan, M.; Thomas, S. M.; Grandis, J. R.; Zhuo, J.; Yao, W.; Newton, R. C.; Friedman, S. M.; Scherle, P. A.; Vaddi, K. *Clinical Cancer Research* **2007**, *13*, 1892.
239. Duffy, M.; Mullooly, M.; O'Donovan, N.; Sukor, S.; Crown, J.; Pierce, A.; McGowan, P. *Clinical Proteomics* **2011**, *8*, 9.
240. Grabowska, M. M.; Sandhu, B.; Day, M. L. *Cellular Signalling* **2012**, *24*, 532.
241. Hundhausen, C.; Misztela, D.; Berkhout, T. A.; Broadway, N.; Saftig, P.; Reiss, K.; Hartmann, D.; Fahrenholz, F.; Postina, R.; Matthews, V.; Kallen, K.-J.; Rose-John, S.; Ludwig, A. *Blood* **2003**, *102*, 1186.
242. Ludwig, A.; Hundhausen, C.; Lambert, M. H.; Broadway, N.; Andrews, R. C.; Bickett, D. M.; Leesnitzer, M. A.; Becherer, J. D. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2005**, *8*, 161.
243. Endres, K.; Postina, R.; Schroeder, A.; Mueller, U.; Fahrenholz, F. *FEBS Journal* **2005**, *272*, 5808.
244. Woods, N. K.; Padmanabhan, J. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 30114.
245. Pupovac, A.; Foster, C. M.; Sluyter, R. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2013**, *432*, 626.
246. Paudel, S.; Kim, Y.-H.; Huh, M.-I.; Kim, S.-J.; Chang, Y.; Park, Y. J.; Lee, K. W.; Jung, J.-C. *Journal of Cellular Biochemistry* **2013**, *114*, 942.
247. Andrews, R. C.; Andersen, M. W.; Cowan, D. J.; Deaton, D. N.; Dickerson, S. H.; Drewry, D. H.; Gaul, M. D.; Luzzio, M. J.; Marron, B. E.; Rabinowitz, M. H. WO2000012083A1; **2000**, 127 pp.
248. Kukar, T. L.; Ladd, T. B.; Bann, M. A.; Fraering, P. C.; Narlawar, R.; Maharvi, G. M.; Healy, B.; Chapman, R.; Welzel, A. T.; Price, R. W.; Moore, B.; Rangachari, V.; Cusack, B.; Eriksen, J.; Jansen-West, K.; Verbeeck, C.; Yager, D.; Eckman, C.; Ye, W.; Sagi, S.; Cottrell, B. A.; Torpey, J.; Rosenberry, T. L.; Fauq, A.; Wolfe, M. S.; Schmidt, B.; Walsh, D. M.; Koo, E. H.; Golde, T. E. *Nature* **2008**, *453*, 925.
249. Munter, L. M.; Voigt, P.; Harmeier, A.; Kaden, D.; Gottschalk, K. E.; Weise, C.; Pipkorn, R.; Schaefer, M.; Langosch, D.; Multhaup, G. *The EMBO Journal* **2007**, *26*, 1702.
250. Richter, L.; Munter, L.-M.; Ness, J.; Hildebrand, P. W.; Dasari, M.; Unterreitmeier, S.; Bulic, B.; Beyermann, M.; Gust, R.; Reif, B.; Weggen, S.; Langosch, D.; Multhaup, G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 14597.
251. Zall, A.; Kieser, D.; Hottecke, N.; Naumann, E. C.; Thomaszewski, B.; Schneider, K.; Steinbacher, D. T.; Schubnel, R.; Masur, S.; Baumann, K.; Schmidt, B. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2011**, *19*, 4903.
252. Baumann, S. Dissertation: Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen zur Behandlung von Morbus Alzheimer Thesis, TU Darmstadt2009.
253. Lennard, M. S.; Tucker, G. T.; Woods, H. F. Stereoselectivity in pharmacokinetics and drug metabolism; Pergamon Press, 1990;
254. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 6430.
255. L. Stryer, J. M. B., J. L. Tymoczko, Biochemie, Spektrum, 6. Auflage.
-

256. Wang, H.; Barreyro, L.; Provasi, D.; Djemil, I.; Torres-Arancivia, C.; Filizola, M.; Ubarretxena-Belandia, I. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *408*, 879.
257. Stefan Göring, Bachelorarbeit : Polyetherderivate substratbindender gamma-Secretase Modulatoren.
258. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., 2006, pp. 16.
259. Agnelli, F.; Suchek, S. J.; Marby, K. A.; Rabuka, D.; Yao, S.-L.; Sears, P. S.; Liang, F.-S.; Wong, C.-H. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 1562.
260. Buchsteiner, A.; Hauß, T.; Dante, S.; Dencher, N. A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798*, 1969.
261. Fitter, J.; Lechner, R. E.; Buldt, G.; Dencher, N. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 7600.
262. Zaccai, G. *Science* **2000**, *288*, 1604.
263. Teixeira, S. C. M.; Zaccai, G.; Ankner, J.; Bellissent-Funel, M. C.; Bewley, R.; Blakeley, M. P.; Callow, P.; Coates, L.; Dahint, R.; Dalglish, R.; Dencher, N. A.; Forsyth, V. T.; Fragneto, G.; Frick, B.; Gilles, R.; Gutberlet, T.; Haertlein, M.; Hauß, T.; Häußler, W.; Heller, W. T.; Herwig, K.; Holderer, O.; Juranyi, F.; Kampmann, R.; Knott, R.; Krueger, S.; Langan, P.; Lechner, R. E.; Lynn, G.; Majkrzak, C.; May, R. P.; Meilleur, F.; Mo, Y.; Mortensen, K.; Myles, D. A. A.; Natali, F.; Neylon, C.; Niimura, N.; Ollivier, J.; Ostermann, A.; Peters, J.; Pieper, J.; Rühm, A.; Schwahn, D.; Shibata, K.; Soper, A. K.; Strässle, T.; Suzuki, J.; Tanaka, I.; Tehei, M.; Timmins, P.; Torikai, N.; Unruh, T.; Urban, V.; Vavrin, R.; Weiss, K. *Chemical Physics* **2008**, *345*, 133.
264. homepage. <https://www.rimadyl.com/>, 19.02.2014.
265. DeCoursey, T. E.; Cherny, V. V. *The Journal of General Physiology* **1997**, *109*, 415.
266. Blake, M. I.; Crespi, H. L.; Katz, J. J. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1975**, *64*, 367.
267. Friedrich Frey, G.; GDCh, veröffentlicht 2005, <https://www.gdch.de/netzwerkstrukturen/fachstrukturen/analytische-chemie/arbeitskreise/ak-chemkrist/einstiegstexte-zur-kristallographie.html> Zugriff: 20.01.2014.
268. Hardy, G. J.; Nayak, R.; Munir Alam, S.; Shapter, J. G.; Heinrich, F.; Zauscher, S. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 19506.
269. Homepage Avanti Polar Lipids Inc.; http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=436&Itemid=268&catnumber=860062,
270. de Almeida, R. F. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 2406.
271. Quinn, P. J.; Wolf, C. *FEBS Journal* **2010**, *277*, 4685.
272. Feigenson, G. W. *Nature Chemical Biology* **2006**, *2*, 560.
273. Sheppard, A. "Molecular modelling: principles and applications (second edition). (Drug Discovery)." Ten Alps Publishing. , 2002.
274. Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, . 2013.
275. http://www.bindingdb.org/jsp/dbsearch/PrimarySearch_ki.jsp?target=DYRK1A&tag=tg&kiunit=nM&icunit=nM&column=ki&submit=Search&energyterm=kJ%2Fmole Vol. 05.03.2014.
276. Neudert, G.; Klebe, G. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51*, 2731.
277. Veronese, F. M.; Mero, A. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* **2008**, *22*, 315.
278. de Greef, T. F. A.; Nieuwenhuizen, M. M. L.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 598.
279. Sun, J.; Stone, G. M.; Balsara, N. P.; Zuckermann, R. N. *Macromolecules* **2012**, *45*, 5151.
280. Song, Y.; Wang, J.; Teng, S. F.; Kesuma, D.; Deng, Y.; Duan, J.; Wang, J. H.; Qi, R. Z.; Sim, M. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 1129.
281. Ponce, M. A.; Tarzi, O. I.; Erra-Balsells, R. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2003**, *40*, 419.

282. Chughtai, M.; Eagan, J. M.; Padwa, A. *Synlett* **2011**, 2011, 215.
283. Wetzel, A.; Gagosz, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50, 7354.
284. Yamakawa, T.; Ideue, E.; Iwaki, Y.; Sato, A.; Tokuyama, H.; Shimokawa, J.; Fukuyama, T. *Tetrahedron* **2011**, 67, 6547.
285. Homepage Cerep. http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_CondExp_Test.asp?test=2781, Stand: 12.03.2014.
286. Son, S.-Y.; Ma, J.; Kondou, Y.; Yoshimura, M.; Yamashita, E.; Tsukihara, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105, 5739.
287. Reniers, J.; Robert, S.; Frederick, R.; Masereel, B.; Vincent, S.; Wouters, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19, 134.
288. Homepage Cerep (MAO-A). http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/Affiche_CondExp_Test.asp?test=191, Status: 12.03.2014.
289. Lo Sardo, V.; Zuccato, C.; Gaudenzi, G.; Vitali, B.; Ramos, C.; Tartari, M.; Myre, M. A.; Walker, J. A.; Pistocchi, A.; Conti, L.; Valenza, M.; Drung, B.; Schmidt, B.; Gusella, J.; Zeitlin, S.; Cotelli, F.; Cattaneo, E. *Nature Neuroscience* **2012**, 15, 713.
290. Cooper, A. M.; Hobson, P. S.; Jutton, M. R.; Kao, M. W.; Drung, B.; Schmidt, B.; Fear, D. J.; Beavil, A. J.; McDonnell, J. M.; Sutton, B. J.; Gould, H. J. *The Journal of Immunology* **2012**, 188, 3199.
291. Xiao, Q.; Zhang, F.; Lin, L.; Fang, C.; Wen, G.; Tsai, T. N.; Pu, X.; Sims, D.; Zhang, Z.; Yin, X.; Thomaszewski, B.; Schmidt, B.; Mayr, M.; Suzuki, K.; Xu, Q.; Ye, S. *Circulation Research* **2013**, 112, 35.
292. Xiao, Q.; Zhang, F.; Grassia, G.; Hu, Y.; Zhang, Z.; Xing, Q.; Yin, X.; Maddaluno, M.; Drung, B.; Schmidt, B.; Maffia, P.; Ialenti, A.; Mayr, M.; Xu, Q.; Ye, S. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2014**, 34, 90.
293. J. Leonhard; B. Lygo; Procter, G., Eds. *Praxis in der organischen Chemie*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1996.
294. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, 7512.
295. Himpel, S.; Tegge, W.; Frank, R.; Leder, S.; Joost, H.-G.; Becker, W. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 2431.
296. Weyler, W.; Salach, J. I. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, 260, 13199.
297. Weissbach, H.; Smith, T. E.; Daly, J. W.; Witkop, B.; Udenfriend, S. *Journal of Biological Chemistry* **1960**, 235, 1160.
298. Labute, P. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2009**, 75, 187.
299. Labute, P. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, 29, 1693.
300. Gerber, P. R.; Muller, K. *Journal of computer-aided molecular design* **1995**, 9, 251.
301. Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2013**, 3, 198.
302. Baciocchi, E.; Chiappe, C.; Del Giacco, T.; Fasciani, C.; Lanzalunga, O.; Lapi, A.; Melai, B. *Organic Letters* **2009**, 11, 1413.
303. Favia, A. D.; Habrant, D.; Scarpelli, R.; Migliore, M.; Albani, C.; Bertozzi, S. M.; Tarozzo, G.; Piomelli, D.; Cavalli, A.; De Vivo, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 8807.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschränkte Fünfecke aus Mini-Mental-Status-Test. ⁴	8
Abbildung 2: Histochemische Färbung eines A β -Plaques (links) und neurofibrillären Bündel (rechts) auf humanem Gehirngewebe. Färbung mit 4,6-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrimidin. Kopie aus A. Boländer <i>et al.</i> 2012 mit freundlicher Genehmigung von Author und Verlag. Copyright 2013 American Chemical Society. ¹⁵	10
Abbildung 3: Strukturformeln der Therapeutika zur Behandlung von AD. ¹⁹	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hypothese der Amyloidkaskade bei AD. ^{5, 22}	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung des nicht-amyloidogenen (links) und amyloidogenen (rechts) Wegs des APP-Metabolismus. ²⁹	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Hyperphosphorylierung von Tau und der anschließenden Aggregation bis zur Bildung von NFTs. ³³	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Membranproteine des γ -Sekretasekomplexes. ²⁶	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Substrat-Proteolyse durch eine Aspartyl-Protease. ⁴²	21
Abbildung 9: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte einiger γ -Sekretase-Inhibitoren. ^{51, 58}	24
Abbildung 10: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte von NSAID-basierten GSMs. ^{52, 65, 67}	27
Abbildung 11: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte CHF5074 17 und E2012 18 . ^{32, 70, 75}	28
Abbildung 12: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte von Carprofen 20 und davon abgeleiteten GSMs. ⁷⁹	29
Abbildung 13: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte von Carbazol 23 und davon abgeleiteten GSM 24 . ⁸¹	30
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Substratphosphorylierung durch DYRK1A. ⁹² ..	31
Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Domänenstruktur von DYRK1A. NLS = Nuclear Lokalisations Signal, KINASE = Kinasedomäne, PEST = (Pro, Glu, Ser, Thr)-reiche Domäne, His = 13-konsekutive-Histidin-Wiederholung, S/T = (Ser, Thr)-reiche Region. ⁹³	32
Abbildung 16: Proteinstruktur von humanen DYRK1A/Harmin 25 -Komplex. PDB: 3ANR. ⁹⁴ ..	32
Abbildung 17: Lokalisation von Harmin 25 in der ATP-Bindungstasche von DYRK1A. Harmin 25 ist in grau und Interaktionen zwischen Harmin 25 und DYRK1A sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Verwendete Software: MOE. ⁹⁴	33
Abbildung 18: Strukturformel und IC ₅₀ -Werte für Harmin 25 . [ATP] = 50 μ M. ¹¹⁶	36

Abbildung 19: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte für die DYRK1A-Inhibitoren INDY 26 und TG003 32 . [ATP] = 10 μM. ⁹⁴	37
Abbildung 20: Strukturformeln von Carbazol 23 , Murraynin 34 , Carprofen 20 und Carvediol 35 . ^{128, 130}	39
Abbildung 21: Strukturformeln vom Antioxidant 36 und Tacrin-Carbazol-Hybrid 38 . ^{130, 133}	40
Abbildung 22: Strukturformel des multifunktionellen Carbazol-Fluorophores SLOH 40 . ¹³⁴	41
Abbildung 23: Strukturformeln der Carbazol-basierten BACE1-Inhibitoren E7T18 42 und 43 . ¹³⁵	42
Abbildung 24: Nomenklatur der Carboline 44-47 . ¹³⁶	42
Abbildung 25: Strukturformel des GSK3β-Inhibitors 48 . ¹³⁷	43
Abbildung 26: Strukturformeln von drei zytotoxischen Carbolinderivaten Dichotomin B 49 , 50 und 51 . ^{138, 139}	43
Abbildung 27: Strukturformeln dreier Carbolinderivate mit Anti-Malaria-Aktivität: Tubulosin 52 , Dihydro-usambarensin 53 und Methyl-δ-carbolin 54 .	44
Abbildung 28: Strukturformeln dreier von Siemens Medical Solutions USA, Inc. evaluierten PET-Liganden 57 , 58 und 59 .	46
Abbildung 29: Aufbau des Carbazolgrundgerüst über Biphenyle 60 anhand der Synthese von (±)-Mahanimbin 61 . (a) Ullmann-Kupplung, 10 % Ausbeute (b) P(OEt) ₃ , Rückfluss, 45 % Ausbeute, (c) Etherspaltung: HBr/HOAc, 90 % Ausbeute, Kondensation: Citral, Pyridin, Rückfluss, 35 % Ausbeute. ¹⁵³	47
Abbildung 30: Synthesemethoden zur Darstellung von Diarylaminen. (a) Ullmann-Goldberg-Kupplung: 1. Cu, K ₂ CO ₃ , Pyridin, 2. 20 % KOH, Ethanol. (b) Buchwald-Hartwig-Aminierung: Pd-Katalysator, Ligand, Base, Lösungsmittel. ¹²⁷	48
Abbildung 31: Zyklisierung zum Carbazol 67 . (a) Pd(OAc) ₂ (katalytische Menge), Cu(II)SO ₄ , Essigsäure, Rückfluss. ¹²⁷	48
Abbildung 32: Fischer-Borsche-Synthese zur Darstellung von Carbazolen. (a) Wässrige Essigsäure, Rückfluss. (b) Chloranil oder Pd/C. ¹²⁷	49
Abbildung 33: Pictet-Spengler-Reaktion zur Darstellung von β-Carbolinen 72b . (a) R ³ COH 71b , Säure, Hitzezufuhr. (b) Oxidationsmittel. ²⁰	50
Abbildung 34: Variation der Pictet-Spengler-Reaktion zur Darstellung von β-Carbolinen 73c . (a) R ¹ CHO, Essigsäure, Rückfluss, 3h. (b) Essigsäure, K ₂ Cr ₂ O ₇ , NaHSO ₃ , NaOH, 100 °C, 20 min. ¹⁶⁹	50
Abbildung 35: Graebe-Ullmann-Reaktion zur Darstellung von α-Carbolin 74a und γ-Carbolin 74b . (a) Decalin, 170-180 °C. ^{136, 170}	50

Abbildung 36: Darstellung von α -Carbolin 75b durch Bestrahlung des Diarylamins 75a . (a) $h\nu$. ^{136, 171}	51
Abbildung 37: Palladium-katalysierter Aufbau vom β -Carbolinderivat 76 . (a) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen, Natrium- <i>tert</i> -Butanolat, Toluol, 100 °C. (b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Natriumcarbonat, DMF, Rückfluss. ^{136, 172}	51
Abbildung 38: Fischer-Reaktion zur Darstellung von γ -Carbolinen 80b . (a) Salzsäure, Ethanol. (b) 10 % Pd/C, Decalin. ^{136, 173}	52
Abbildung 39: Fischer-Reaktion zur Darstellung von β -Carbolin 82a und δ -Carbolin 82b	52
Abbildung 40: Schematische Darstellung des Aufbaus von ADAM10. Pro = Prodomäne, MP = Metalloprotease-Domäne, Dis = Disintegrin-Domäne, Cys = Cystein-reiche-Domäne, TMD = Transmembrandomäne, Z = zytoplasmatische Domäne. ^{175, 176, 179, 185}	54
Abbildung 41: Schematische Darstellung der Zink-vermittelten Proteolyse eines Substrats durch eine Metalloprotease. ¹⁸⁹	56
Abbildung 42: Strukturformeln von Substanzen, die eine erhöhte α -Sekretase/ADAM10-Aktivität auslösen. ²²²⁻²²⁴	61
Abbildung 43: Strukturformeln der vorgestellten ADAM10-Inhibitoren. ^a Die Strukturformel von INBC8765 90 wurde aus dem IUPAC-Namen erstellt. ^{236, 238, 241}	63
Abbildung 44: Verbesserte Synthese des ADAM10-Inhibitors GI254023X 91 . ²³⁵	64
Abbildung 45: Hypothese des Bindungsmodus von NSAID-abgeleiteten GSMs an APP innerhalb der γ -Sekretase. Kopie aus Baumann <i>et al.</i> , BMCL, Vol.19, S. 6986. Copyright 2009 mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. ⁸²	68
Abbildung 46: Strukturformeln der Leitstruktur (BSc3030) 94 und des geplanten Amidcarbazolderivats (BSc4531) 95 . ⁷⁹	68
Abbildung 47: Retrosynthetischer Ansatz für die Synthese des Amidcarbazols 95 (BSc4531).	69
Abbildung 48: Synthese des Amidcarbazolderivats 95 (BSc4531).	69
Abbildung 49: Strukturformeln der Leitstruktur (BSc3030) 94 und des geplanten Carbazolderivats (BSc4530) 98 . ⁷⁹	79
Abbildung 50: Retrosynthetischer Ansatz für die Synthese des Carbazolderivats 98 (BSc4530).	80
Abbildung 51: Synthese des Carbazolderivats 98 (BSc4530).	81
Abbildung 52: Vergleich der Abstände der polaren Sauerstoffatome bei PEG und PPG.	83
Abbildung 53: In Vorarbeiten synthetisierte PEG-Carprofenderivate 105 (BSc4098), 106 (BSc4100), und 107 (BSc4101).	84

Abbildung 54: Strukturformeln der geplanten PEG-Carprofenderivate (BSc4850) 108 und (BSc4852) 109 .	84
Abbildung 55: Strukturformel der geplanten PPG-Derivate 110 (BSc4851), 111 (BSc5050), 112 , 113 und 114 .	84
Abbildung 56: Synthese der PEG-Carprofenderivate 108 und 109 . $n = 1, 2$.	85
Abbildung 57: Retrosynthetischer Ansatz für die Verlängerung einfacher Propanolbausteine.	86
Abbildung 58: Synthese des Benzyl-geschützten Carprofenderivats 124 .	87
Abbildung 59: Synthese des Carprofenderivats BSc4849 125 .	88
Abbildung 60: Synthese des monopropylierten Carprofenderivats 110 .	90
Abbildung 61: Retrosynthetischer Ansatz zur dritten Strategie zum Aufbau der PPG-Derivate 111-114 .	92
Abbildung 62: Synthese vom Alkohol 130a und anschließender weiterer Umsetzung zu 129a , 134a , 135a .	93
Abbildung 63: Synthese des PPG-Carprofenderivat 111 (BSc5050).	94
Abbildung 64: Synthetisierte PEG- und PPG-Carprofenderivate 108 , 109 , 110 , 111 .	95
Abbildung 65: Retrosynthetischer Ansatz zur Erstellung von deuterierten Carprofenderivaten. R = Rest, der sowohl in protonierter, wie auch in deuterierter Form dargestellt werden kann.	96
Abbildung 66: Strukturformeln des protonierten <i>N</i> -Benzylcarprofens (BSc4077) 136 und des deuterierten <i>N</i> -Benzyl- d_7 -carprofens (BSc4033) 137 .	97
Abbildung 67: Strukturformeln des protonierten 9-(4-(Thioanisol)sulfonyl)carprofens (BSc4130) 138 und des deuterierten 9-(4-((Methylthio- d_3)phenyl)sulfonyl)carprofens (BSc4343) 139 .	97
Abbildung 68: Retrosynthetischer Ansatz für die Einführung einer protonierten oder deuterierten Methylgruppe.	98
Abbildung 69: Schematische Darstellung der Synthese von BSc4343 139 .	100
Abbildung 70: Strukturformeln der Bausteine der Modellmembran. ^{268, 269}	103
Abbildung 71: Graphische Darstellung der Messung des temperaturabhängigen Verhaltens der Lipide. Rot: Streuwinkel des ersten Braggschen Reflexes, blau: Streuwinkel des zweiten Braggschen Reflexes.	103
Abbildung 72: Streulängendichte-Profile der Benzylcarprofenderivate 136 (protoniert: rot) und 137 (deuteriert: blau), sowie der Differenz zwischen den beiden Profilen (schwarz). SLD ist die Streulängendichte in willkürlicher Einheit (a.u., <i>arbitrary unit</i>), Z ist der Abstand zur Mitte der Lipid-Doppelschicht in Å.	104

Abbildung 73: Streulängendichte-Profile der Sulfonylcarprofenderivate 138 (protoniert: rot) und 139 (deutert: blau), sowie der Differenz zwischen den beiden Profilen (schwarz) bei 15 °C. SLD ist die Streulängendichte in willkürlicher Einheit (a.u., <i>arbitrary unit</i>), Z ist der Abstand zur Mitte der Lipid-Doppelschicht in Å.	105
Abbildung 74: Streulängendichte-Profile der Sulfonylcarprofenderivate 138 (protoniert: rot) und 139 (deutert: blau), sowie der Differenz zwischen den beiden Profilen (schwarz) bei 37 °C. SLD ist die Streulängendichte in willkürlicher Einheit (a.u., <i>arbitrary unit</i>), Z ist der Abstand zur Mitte der Lipid-Doppelschicht in Å.	105
Abbildung 75: Schematische Darstellung der erwarteten Orientierung des Sulfonyl-Carprofenderivats 138 in der Membran.	106
Abbildung 76: Schematische Darstellung der, basierend auf den Ergebnissen der Neutronenbeugungsexperimente, angepassten Orientierung des Sulfonyl-Carprofenderivats 138 in der Membran.	107
Abbildung 77: Schematische Darstellung der, basierend auf den Ergebnissen der Neutronenbeugungsexperimente, angepassten Orientierung des Benzylcarprofenderivats 136 in der Membran.	107
Abbildung 78: Das am Besten bewertete Pharmakophormodell inklusive angepasstem Harmin 25 . Lila Kugel: hydrophobes Zentrum, orangene Kugel: aromatisches System, blaue Kugel: Wassestoffbrückenbindungs-Akzeptor.	113
Abbildung 79: Docking von Harmin 25 in die Röntgenkristallstruktur des Harmin 25 /DYRK1A-Komplexes. Grün – Kohlenstoffatome des Proteins, gelb – natürliches Harmin 25 aus PDB-Daten, rot – Konformation 1 der Dockingergebnisse.	115
Abbildung 80: Strukturformeln der Leitstruktur Harmin 25 (BSc4968) und der parallel von A. Nazari dargestellten Derivate 148 (BSc4966), 149 (BSc4967), 150 (BSc4961), 151 (BSc4962) und 152 (BSc4964) zur Evaluation von Feature F3 und F4.	117
Abbildung 81: Strukturformeln der Leitstruktur Harmin 25 (BSc4968) und der geplanten Derivate 153 (BSc5073), 154 (BSc5071), 155 (BSc5041) und 156 (BSc5042) zur Evaluation von F4.	118
Abbildung 82: A Durch Protein/Liganden-Docking berechneter Bindungsmodus von 155 mit DYRK1A. B Anpassung von 155 ins Pharmakophormodell.	118
Abbildung 83: A Strukturformel des N-Heptylharmin 157 (BSc5072), B Docking von N-Heptylharmin 157 in DYRK1A. Weiß: Kohlenstoffatome, blau: Stickstoffatome, rot: Sauerstoffatom.	119
Abbildung 84: Strukturformeln der geplanten chlorierten Harminderivate 158 (BSc5049) und 159 (BSc5048).	120

Abbildung 85: Protein/Liganden-Docking von A 6-Chlorharmin 158 mit zusätzlicher Interaktion zu Glu239 im Vergleich zu B 8-Chlorharmin 159	120
Abbildung 86: Strukturformel des Dimethylharminderivats 160	120
Abbildung 87: Docking des Dimethylharminderivats 160 . Grün – Kohlenstoffatome des Proteins, gelb – natürliches Harmin 25 aus PDB-Daten, rot – beste Konformation von 160 des Dockings.	121
Abbildung 88: Retrosynthetischer Ansatz für die Synthese der O-substituierten Derivate 153-156	121
Abbildung 89: Synthese der in der Methoxyposition verlängerten Derivate 153-156	122
Abbildung 90: Synthese von <i>N</i> -Heptylharmin 157	123
Abbildung 91: Synthese der chlorierten Harminderivate 158 und 159	123
Abbildung 92: Retrosynthetischer Ansatz zur Darstellung von Methylharmin 160	124
Abbildung 93: Synthese des Derivats 176 nach Padwa <i>et al.</i> ²⁸²	125
Abbildung 94: Synthese des Zwischenproduktes 168	127
Abbildung 95: A Protein/Liganden-Docking von Harmin 25 (grün) in MAO-A (PDB: 2Z5X) und der berechnete Bindungsmodus vom PEG-Harminderivat 156 (türkis). In gelb ist das essentielle Koenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) dargestellt. B Protein/Liganden-Docking des PEG-Harminderivats 156 (türkis) in MAO-A mit Darstellung der Oberfläche der aktiven Tasche (grau).	132
Abbildung 96: Graphische Darstellung der berechneten DSX-Potentiale je Atom der Liganden. Grün: Atome, die positiv zur Bindung beitragen, rot: Atome, die negativ zur Bindung beitragen. Die Größe der Oberflächen entspricht der Amplitude des entsprechenden Potentials. A Harmin 25 , B Propylderivat 149 , C <i>N</i> -Heptylharmin 157 , D 6-Chlorharmin 158 , E 8-Chlorharmin 159	133
Abbildung 97: Darstellung der Selektivität anhand der Gegenüberstellung der DYRK1A- und MAO-A-Aktivitäten von Harmin 25 und den Derivaten 149 , 157 und 158	136
Abbildung 98: Zusammenfassung der ermittelten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Harminderivaten zu DYRK1A anhand von Harmin 25 im Pharmakophormodell.	137
Abbildung 99: Strukturformel und biologische Daten des potentesten und selektivsten DYRK1A-Inhibitors 157	137
Abbildung 100: Mögliche Positionen für weitere Derivatisierungen.	138

7.2. Erklärungen

Binia Drung
Hügelstr. 182
60431 Frankfurt

17.07.2014

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

[Binia Drung]

Binia Drung
Hügelstr. 182
60431 Frankfurt

17.07.2014

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

[Binia Drung]

7.3. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.